

Aus der Abteilung Innere Medizin der

Franz-Volhard-Klinik

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Dietz

Charité

Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

**UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION VON ZELLWACHSTUM UND ZELLTOD IM  
HERZEN**

Habilitationsschrift

vorgelegt von:

Dr. med. Rüdiger v. Harsdorf

Berlin, 1999

## INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<b>1.</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b><i>Erster Abschnitt: Untersuchungen genregulatorischer Mechanismen, die kardialen Wachstum zugrundeliegen</i></b>	<b>5</b>
2.1	<i>Teil 1: Entwicklung eines in vivo-Modells zur Analyse der Genregulation im Myokard</i>	5
2.1.1	<i>Einleitung</i>	5
2.1.2	<i>Methoden</i>	6
2.1.3	<i>Ergebnisse</i>	7
2.1.4	<i>Diskussion</i>	16
2.2.	<i>Teil 2: Identifizierung des cis-regulatorischen Elements, das die Induktion des ANF-Gens bei der Myokardhypertrophie vermittelt</i>	17
2.2.1	<i>Einleitung</i>	17
2.2.2	<i>Methoden</i>	19
2.2.3	<i>Ergebnisse</i>	23
2.2.4	<i>Diskussion</i>	31
<b>3.</b>	<b><i>Zweiter Abschnitt: Die Bedeutung der Zellzyklusregulation für Wachstum und programmierten Zelltod kardialer Zellen evaluiert anhand der Überexpression des Transkriptionsfaktors E2F-1</i></b>	<b>35</b>
3.1	<i>Einleitung</i>	35
3.2	<i>Methoden</i>	36
3.3	<i>Ergebnisse</i>	40

3.4	<i>Diskussion</i>	49
4.	<i>Dritter Abschnitt: Signalwege des programmierten Zelltods in Kardiomyozyten induziert durch freie Sauerstoffradikale</i>	52
4.1	<i>Einleitung</i>	52
4.2	<i>Methoden</i>	53
4.3	<i>Ergebnisse</i>	56
4.4	<i>Diskussion</i>	63
5.	<i>Literaturverzeichnis</i>	65
6.	<i>Alphabetische Auflistung verwandter Abkürzungen</i>	73
7.	<i>Danksagungen</i>	74

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Induktion von pathologischem Wachstum in Kardiomyozyten sowie Verlust vitaler kontraktile Myokardelemente durch Aktivierung des programmierten Zelltods bilden die zelluläre und funktionelle Grundlage für die Entstehung der Herzinsuffizienz. Somit ist die derzeitige pharmazeutische Therapie der Herzinsuffizienz weniger kausal als vielmehr symptomatisch anzusehen. Denn die Mechanismen, die unter *in vivo*-Bedingungen Wachstum und Zelltod in Kardiomyozyten kontrollieren, als auch die dabei ablaufenden intrazellulären Signalwege sind bis *dato* weitgehend unklar. Streng genommen wäre der einzige kausale therapeutische Ansatz die Induktion einer Regeneration des morphologisch und funktionell veränderten Myokards durch:

1. Verhinderung des gesteigerten Zelltodes,
2. Induktion der Zellteilung vitaler Kardiomyozyten.

Um dies zu erreichen, müssen zunächst die molekularen Grundlagen erkannt werden, die zur Induktion, bzw. Hemmung von Zellteilung und Zelltod kardialer Myozyten führen. Das Ziel der

vorliegenden Arbeit war es, Mechanismen zu identifizieren, die an der Induktion von Zellwachstum und/oder Zelltod von Kardiomyozyten beteiligt sind.

Um Faktoren zu identifizieren, die bei der Induktion pathologischen Wachstums des Herzens (schlechthin als Myokardhypertrophie bezeichnet) eine Rolle spielen, wurde zunächst ein Modell entwickelt, das es erlaubt, genregulatorische Elemente *in vivo* zu identifizieren. Um hierbei möglichst nahe an die hämodynamischen Verhältnisse des Menschen zu gelangen, wurde zur Etablierung eines geeigneten Tiermodells der Hund gewählt. Es wurden die verschiedenen Variablen, die die Expression *in vivo* ins Myokard injizierter Reportergenplasmide regulieren, analysiert. Es stellte sich heraus, daß die Injektion von Reportergenkonstrukten ins Myokard des Hundes ein ausgezeichnetes Modell darstellt zur Analyse der Genregulation im Myokard großer Säugetierspezies.

Mit Hilfe dieses Modells gelang im Weiteren durch Injektion von ANF-Promotorkonstrukten mit anschließender Myokardhypertrophieentwicklung nach *aortic banding* die Identifizierung einer AP1-Bindungsstelle im Promotor des ANF-Gens (atrialer natriuretischer Faktor) als *cis*-regulatorisches Element, das für die Aktivierung des ANF-Gens bei der Druckhypertrophie verantwortlich ist. In der Tat korreliert die Aktivierung des ANF-Gens bei der Druckhypertrophie mit einer verstärkten Bindung von nativem AP1 an dieses *cis*-regulatorische Element. Darüberhinaus bindet ein anderes, noch nicht charakterisiertes konstitutiv exprimiertes und durch Druckhypertrophie nicht in seiner DNA-Bindungsaktivität verändertes Protein an die AP1-Stelle im ANF-Promotor.

Da das Wachstum eines Organs prinzipiell über eine Zellvergrößerung und/oder eine Zellvermehrung erreicht werden kann und Kardiomyozyten letztere Eigenschaft postnatal verlieren, ist davon auszugehen, daß der postnatale Zellzyklusarrest eine kausale Grundlage für die Entwicklung der pathologischen Myokardhypertrophie und damit für den Phänotyp des insuffizienten Myokards bildet. Zur Identifizierung von Faktoren, die für den Zellzyklusarrest von Kardiomyozyten verantwortlich sind, wurde der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor E2F-1, der in der Regel für die Aktivierung des Zellzyklus verantwortlich ist, in isolierte Kardiomyozyten mittels adenoviralem Gentransfer eingebracht. Die Überexpression von E2F-1 in Kardiomyozyten führte zur Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose). Die Tatsache, daß andernorts mitogen wirkende Faktoren wie E2F-1 in Kardiomyozyten Apoptose induzieren, ist ein wichtiger Hinweis für die enge funktionelle Verknüpfung zwischen Zellwachstum und Zelltod in Kardiomyozyten. Die Apoptose wurde in Anwesenheit von Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) supprimiert und es kam nun zur Reinduktion des Zellzyklus, was sich in einer gesteigerten DNA-Syntheserate widerspiegelte. Eine gesteigerte Mitoserate konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. IGF-I allein hatte keinen mitogenen Effekt auf Kardiomyozyten. Es zeigte sich weiterhin, daß die Zellzyklusinhibitoren p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrestes von Kardiomyozyten zu spielen scheinen, denn in der Anwesenheit von IGF-I verschwanden in Kardiomyozyten, die E2F-1 exprimierten, diese Faktoren aus den Komplexen, die sie mit Zyklinen und zyklin-abhängigen Kinasen (cdks) bilden.



Um zu verstehen, über welche Faktoren Apoptose in Kardiomyozyten induziert und über welche intrazellulären Signalwege sie vermittelt wird, wurden isolierte Kardiomyozyten mit freien Sauerstoffradikalen (ROS) exponiert, von denen bekannt ist, daß sie in bestimmten Zellen in einem bestimmten Dosisbereich Apoptose erzeugen können. Obwohl beides,  $H_2O_2$  und  $O_2^-$ , zur Induktion von Apoptose in Kardiomyozyten führt, werden jeweils unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktiviert. So führt  $H_2O_2$  zur Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C und Spaltung von PARP, was mit einer Translokation von Bax an die Mitochondrien und seiner Interaktion mit dem anti-apoptotischen Faktor Bcl-2 einhergeht. Dies führt zur Aktivierung der Kaspase 3 (CPP32).  $O_2^-$  hingegen führt zur Aktivierung der Kaspase 6 (Mch2 $\alpha$ ) und Spaltung von Lamin A.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit erstmals, daß: 1. der *in vivo*-Transfer von Reportergenkonstrukten ins Myokard von Hunden eine valide Methode darstellt, um myokardspezifische Regulation der Genexpression zu untersuchen; 2. eine AP1-Bindungsstelle im Promotor des ANF-Gens verantwortlich für die Transaktivierung dieses Markergens der Myokardhypertrophie ist; 3. der Versuch der Induktion kardialen Wachstums durch Überexpression des Zellzyklusaktivators E2F-1 in Apoptose resultiert und IGF-I ein potenter anti-apoptischer Faktor für Kardiomyozyten darstellt; 4. die Zellzyklusinhibitoren p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> möglicherweise für den Zellzyklusarrest terminal differenzierter Kardiomyozyten verantwortlich sind; 5. ROS potente Stimulatoren der Apoptose kardialer Myozyten darstellen; 6. in Kardiomyozyten unterschiedliche, Cytochrom C-abhängige und -unabhängige, Apoptose vermittelnde Signalwege existieren.

## **2. Erster Abschnitt: Untersuchungen genregulatorischer Mechanismen, die kardialen Wachstum zugrundeliegen**

### **2.1 Entwicklung eines *in vivo*-Modells zur Analyse der Genregulation im Myokard**

#### **2.1.1 Einleitung**

Bis vor kurzem wurde die Regulation der Genexpression in transienten Transfektions-Assays von Zellkulturen (Henderson et al., 1989; Kariya et al., 1991; LaPointe et al., 1988; Rosenzweig et al., 1991; Wu et al., 1989) und/oder durch Verwendung transgener Tiermodelle untersucht (Field, 1988; Rockman et al., 1991). Besonders im Falle terminal differenzierter Zellen wie den Kardiomyozyten war der Gebrauch kultivierter Zellen durch eine niedrige Transfektionseffizienz und durch die Schwierigkeit, eine genügend hohe Quantität primärer Zellen zu erreichen, beeinträchtigt. Letzteres insbesondere, da bisher keine phänotypisch geeignete Zelllinie für Kardiomyozyten existiert. Diese Probleme sind besonders offensichtlich in Studien, die die Genexpression im Myokard zum Ziele haben, da die kultivierten Zellen nicht in ihrer natürlichen Umgebung gehalten werden. Aus diesen Gründen besteht eine große Notwendigkeit für alternative Ansätze zur Untersuchung der Regulation der Genexpression im Myokard.

Die Einschleusung exogener DNA in Keimzellen und die Züchtung transgener Tiere hat die Analyse

der Genregulation in physiologisch sinnvollen Umgebungen, aber auch in der Entwicklung und Organdifferenzierung (Field, 1988) deutlich verbessert. Allerdings sind diese Ansätze aus praktischen Gründen auf kleine Säugetiere - Mäuse im Speziellen - beschränkt, hauptsächlich aus Kostengründen und der Tatsache, daß der größte Anteil genetischer Information über Säuger von der Maus stammt. Deshalb stellte die kürzlich veröffentlichte Demonstration des in vivo-Gentransfers durch einfache Injektion nackter Plasmid-DNA in den Skelettmuskel der Maus (Wolff et al., 1990) eine bedeutende Entwicklung dar, ein Ansatz, geeignet zur Analyse der Genregulation, der viele Vorteile des in vitro-Transfektions-Assays mit dem transgenen Tiermodell zur Kurzzeitanalyse kombiniert.

Das Potential, nackte Plasmid-DNA, die direkt injiziert wurde, aufzunehmen und zu exprimieren, ist nicht auf den Skelettmuskel begrenzt. Kürzlich haben mehrere Arbeitsgruppen von der Möglichkeit der Expression von Plasmid-DNA, die ins Herz injiziert wurde, berichtet (Acsadi et al., 1991; Buttrick et al., 1992; Kitsis et al., 1991; Lin et al., 1990; Lompre et al., 1981). Hierbei scheint die Expression der injizierten DNA auf den Injektionskanal beschränkt zu sein (Buttrick et al., 1992; Lin et al., 1990) und nur eine geringe Anzahl von Zellen exprimieren das Transgen tatsächlich (Acsadi et al., 1991). Die Transfektionseffizienz scheint mit zirkulärer Plasmid-DNA höher zu sein als mit linearer (Buttrick et al., 1992). Außerdem bleiben die injizierten DNA-Fragmente episomal (Wolff et al., 1990).

Nagetiere unterscheiden sich wesentlich in ihrer kardiovaskulären Physiologie und Pathophysiologie vom Menschen. Dies betrifft die Herzfrequenz, das Muster kardialer kontraktile Isoformen (Lompre et al., 1981; Lompre et al., 1984) und die Induktion des Isoform-Switches während der Myokardhypertrophie (Izumo et al., 1987; Lompre et al., 1979). Weiterhin sind große Säugetiere - insbesondere Hunde - das Modell der Wahl für physiologische Untersuchungen, obwohl kleine Säugetiere das Modell der Wahl für genetische und molekulare Analysen sind. Dieses und die Tatsache, daß die kardiale Physiologie zwischen Hunden und Menschen ähnlicher ist, macht diese Spezies das Tier der Wahl für die Analyse der Genregulation unter experimentellen Bedingungen, die physiologisch bedeutend sind und die relevante Einblicke in Expressionsmuster vorherrschend in Menschen liefern können.

Aus all diesen Gründen haben wir ein Modell entwickelt, indem wir durch Injektion von Plasmid-DNA in Hundeherzen die Genexpression in großen Säugern untersuchten.

### 2.1.2 Methoden

#### *Reporter-gen-Plasmide*

MSV-CAT wurde konstruiert durch Fusion der kodierenden Sequenz des Gens der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (Gorman et al., 1982) an das *long terminal repeat* des Maus Sarcoma Virus (MSV). Rous Sarcoma Virus (RSV)-Luciferase wurde andernorts beschrieben (DeWet et al., 1987). -

256ApoAI-CAT wurde konstruiert durch die Fusion der Nukleotidsequenz -256 bis +500 der 5'-Region des Apolipoprotein A-I Gens der Ratte an das CAT-Gen (Widom et al., 1991). Die seriellen 5'-Deletionen des  $\beta$ MHC Promotors beinhalteten das -3.300- $\beta$ MHC-CAT, -667- $\beta$ MHC-CAT, -354- $\beta$ MHC-CAT und -215- $\beta$ MHC-CAT Konstrukt, welche genomische Fragmente des  $\beta$ MHC-Gens der Ratte von -3.300, bzw. -667, -354, -215 und -186 bis zu +38 relativ zur transkriptionellen Startstelle fusioniert mit dem CAT-Gen und inseriert an der BamHI-Stelle des Polylinkers des pUC18 Plasmids darstellen (Thompson et al., 1991). Das Fragment -607 bis +32 des  $\alpha$ MHC Promotors der Ratte verbunden mit dem CAT-Gen wird als -607- $\alpha$ MHC-CAT bezeichnet (Mahdavi et al., 1984).

#### *Präparation der Tiere und Injektion der Plasmid-DNA*

Hunde wurden mit Xylazin (10 mg/kg i.m.) prämediziert; Vollnarkose wurde mit Thiamylal (10-20 mg/kg i.v.) erzielt und mit Halothan (0.5-1.5 % (Vol.)) aufrecht erhalten. Unter sterilen Operationsbedingungen wurde eine linkslaterale Thorakotomie im 5. Intercostalraum durchgeführt und das Perikardium freipräpariert. Das Perikard wurde eröffnet und der Apex des Herzens mit einer Naht verankert. Bis zu 30 4mm<sup>2</sup> große Dacron-Flicken wurden auf die epikardiale Oberfläche genäht und damit die Injektionsstellen markiert. Daraufhin wurde die in 1 x PBS aufgelöste Plasmid-DNA mit einer 30 Gauge Nadel lotrecht ins Epikard injiziert. Das Volumen der DNA-Lösung betrug - wenn nicht anders angegeben - jeweils 200  $\mu$ l und die Konzentration der DNA 0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l für die CAT-Reporterkonstrukte und 0.075  $\mu$ g/ $\mu$ l für das Kontroll-Luciferase-Reporter-gen. Die Konstrukte wurden den markierten Injektionsstellen zufällig zugeordnet, um mögliche regionale Unterschiede auszugleichen. Um für die Injektionseffizienz zu kontrollieren, wurde das Kontroll-Plasmid (RSV-Luciferase) stets mit den CAT-Konstrukten koinjiziert. Nach den Injektionen wurde die Wunde verschlossen. Nach der Operation wurden die Tiere für eine Weile in einem Aufwachraum observiert. Die Tiere vertrugen den Eingriff gut und Blutdruck und Puls wurden täglich bestimmt.

#### *Präparation des Gewebes*

Je nach Angabe wurden die Tiere nach einem Zeitraum von 3 bis 21 Tagen nach der Operation mit einer Überdosis Pentobarbital (50 mg/kg i.v.) getötet, das Herz rasch entfernt und in eiskalte Kochsalzlösung gelegt. Die markierten Injektionsstellen wurden als transmurale Blöcke herausgeschnitten und sofort in Flüssigstickstoff gelagert. Anschließend wurden die Gewebeproben bei -80° Celsius bis zur weiteren Präparation aufbewahrt. Direkt vor dem CAT-Assay wurden die Gewebeproben in jeweils 1 ml Homogenisierungspuffer ((25 mM Glycyl-Glycin, pH 7.8, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, pH 8.0, und 1 mM DTT) homogenisiert. Die Suspension wurde mit 6.000 g bei 4° Celsius für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde auf den Proteingehalt durch entsprechende Verdünnung mit Homogenisierungspuffer normalisiert mittels Bradford-Assay (Bio-Rad Laboratories).

### *CAT-Assay*

Die CAT-Assays wurden durchgeführt wie von Seed und Sheen ursprünglich beschrieben (Seed and Sheen, 1988). Hierbei wurden 10% des für seinen Proteingehalt normalisierten Überstandes, 1  $\mu\text{L}$   $^{14}\text{C}$ -markiertes Chloramphenicol (0.25 mCi) und 5  $\mu\text{L}$  n-Butyryl Coenzym A (5mg/mL) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 125  $\mu\text{L}$  mit Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.0) aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde auf einem Hitzeblock bei 37° Celsius für 2 Stunden inkubiert. Durch Zugabe von 300  $\mu\text{L}$  Xylen wurde das acetylierte Chloramphenicol von der Suspension extrahiert. Aliquots von 200  $\mu\text{L}$  wurden in einem Szintillationszähler (Beckman Instruments, Modell LS 6000IC) ausgezählt.

### *Luciferase-Assay*

Der Luciferase-Assay wurde durchgeführt wie von Brasier et al. beschrieben (Brasier et al., 1989). Hierbei wurden 10% des für seinen Proteingehalt normalisierten Überstandes auf ein Volumen von 100  $\mu\text{L}$  durch Zugabe des Homogenisierungs-Puffers (25 mM Glycyl-Glycin, pH 7.8, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4 mM EGTA, pH 8.0, und 1 mM DTT) gebracht und mit 360  $\mu\text{L}$  Reaktions-Puffer (25 mM Glycyl-Glycin, pH 7.8, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4 mM EGTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 15mM  $\text{KPO}_4$ , pH 7.8, 2 mM ATP, 0.3% Triton X-100) vermischt. Unmittelbar nach Zugabe von 0.2 mM D-Luciferin zum Reaktionsgemisch wurde die Lichtemission in einem Luminometer bestimmt (1251 Luminometer, LKE Wallac, Turku, Finnland). Dabei werden die Lichteinheiten dargestellt als Integral der Aktivität über 20 Sekunden. Nur Werte, die sich innerhalb des linearen Bereiches der Reaktion befanden, wurden für die Analyse verwandt.

### *Datenanalyse*

Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM). Für die statistische Analyse der CAT-Werte über die Zeit und regional über den linken Ventrikel wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. ANOVA wurde auch angewandt für den Vergleich zwischen den verschiedenen Promotor-Konstrukten und den verschiedenen Injektionstechniken. Wenn signifikant, so wurden Vergleiche zwischen den Gruppen mittels ungepaartem t-Test mit der Bonferroni-Angleichung durchgeführt. Lineare Regressionsanalyse wurde angewandt, um die Korrelation zwischen den CAT- und Luciferase-Aktivitäten in den Kotransfektionsexperimenten zu analysieren. Hierzu wurde das Programm Statview verwandt und ein  $p < 0.05$  wurde als signifikant erachtet.

## 2.1.3 Ergebnisse

### *Die Expression von Genkonstrukten injiziert ins Myokard erfolgt nach einer Dosis-Wirkungs-Kinetik*

Um die Effizienz und Kinetik der Expression intrakardial injizierter DNA zu bestimmen, wurde ein

konstantes Volumen von 200  $\mu\text{l}$  mit steigenden Konzentrationen von MSV-CAT (10-300  $\mu\text{g}$  pro Injektionsstelle) in die Hundeherzen injiziert. Wie der Abb. 1 zu entnehmen ist führten bereits 10  $\mu\text{g}$  DNA zu einem CAT-Signal, das 10-fach höher als das Hintergrundsignal war. Im Bereich zwischen 10-200  $\mu\text{g}$  wies die Dosis-CAT-Aktivitäts-Beziehung eine lineare Kinetik auf ( $y = 0.2x + 10.8$ ;  $r^2 = 0.54$ ). Höhere DNA-Mengen resultierten in einem Plateau, was eine Sättigungskinetik für die DNA-Aufnahme, Transkription, oder beides widerspiegelt. Diese Daten zeigen, daß das Myokard des Hundes eine große Kapazität für die Aufnahme injizierter DNA über einen weiten Konzentrationsbereich besitzt. Die Steigung der Kurve zeigt jedoch klar, daß die Effizienz der Expression bei den niedrigen Dosen am höchsten ist. Die Gründe hierfür sind bislang unklar. Auf jeden Fall belegen diese Daten die dringende Notwendigkeit für interne Standards, wenn die Expression zwischen verschiedenen Konstrukten verglichen werden soll.

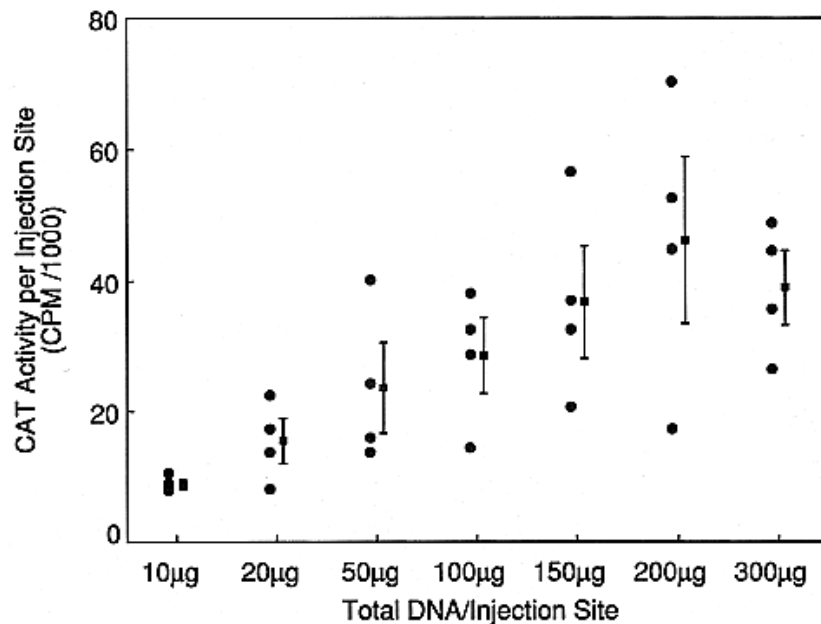
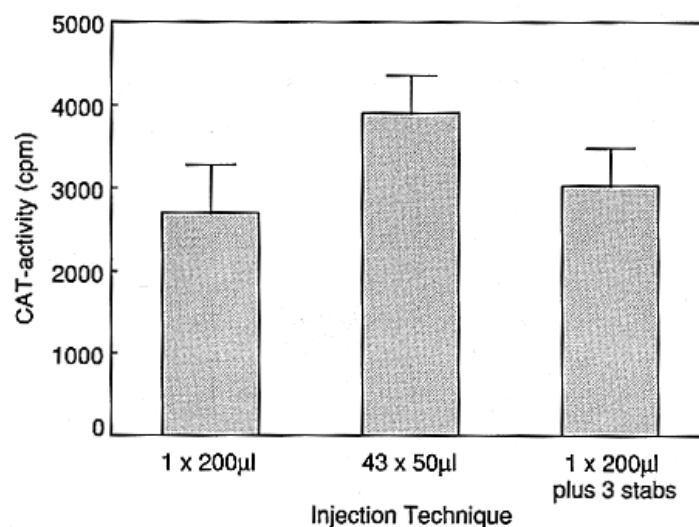


Abbildung 1: Dosis-Wirkungs Beziehung zwischen der Menge injizierter DNA und der CAT-Aktivität. Scatter-Plot der CAT-Aktivität pro Injektionsstelle versus Gesamtmenge der DNA (MSV-CAT) pro Injektionsstelle ist dargestellt. Verschiedene DNA-Konzentrationen wurden in einem konstanten Volumen von 200  $\mu\text{l}$  injiziert. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) sind als schwarze Vierecke dargestellt ( $n = 4$  für jede Dosis)

*Das Ausmaß des durch die Injektion gesetzten Gewebstraumas korreliert nicht mit dem Grad der Genexpression*

Drei verschiedene Injektionstechniken wurden in einem Experiment verglichen, um den Einfluß der injektions-bedingten Gewebsverletzung auf das Ausmaß der Genexpression zu untersuchen. Da es möglich wäre, daß die Ergebnisse auf der Aufnahme und Expression von Plasmid-DNA in nicht-muskulären Herzzellen beruht und damit keine Bedeutung für die Untersuchung der Biologie des

Herzmuskels hätte, wurden Reporter-genkonstrukte getestet, deren Expression auf Muskelzellen beschränkt ist. Obwohl bis dato keine Studien publiziert wurden, aus denen das Muster kontraktile Isoformen im Hundeherzen hervorgeht, so zeigten selbst durchgeführte RNA-Analysen, daß im Hundeherzen wie bei anderen großen Säugern die  $\beta$ MHC die prädominierende Isoform darstellt, während  $\alpha$ MHC in nur sehr geringen Mengen vorhanden ist (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden nun  $\beta$ MHC-Reporter-genkonstrukte verwandt, die bereits in früheren Studien charakterisiert worden waren (Thompson et al., 1991). In der ersten Gruppe wurden 200  $\mu$ l des -667- $\beta$ MHC-CAT-Konstruktes mittels einmaliger Injektion verabreicht. In der zweiten Gruppe wurden 4 x 50  $\mu$ l derselben Konzentration dieses Konstruktes pro Injektionsstelle injiziert. Um für die Verteilung der DNA-Lösung im Gewebe zu kontrollieren, wurde in einer dritten Gruppe mit einer Injektion 200  $\mu$ l derselben Konzentration des Reporter-genkonstruktes einmalig injiziert und an derselben Injektionsstelle drei weitere Insertionen der Injektionsnadel, aber ohne Injektion von DNA-Lösung, vorgenommen. Wie in der Abb. 2 dargestellt so bestand kein signifikanter Unterschied in der Expression der Reporter-genkonstrukte zwischen diesen drei Gruppen (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Da in der Gruppe mit der Injektion von 4 x 50  $\mu$ l Plasmid-Lösung ein Trend zu höherer Expression zu erkennen war und in dieser Gruppe die geringste Standardabweichung bestand, wurde in weiteren Experimenten diese Methode der Injektion verwandt.

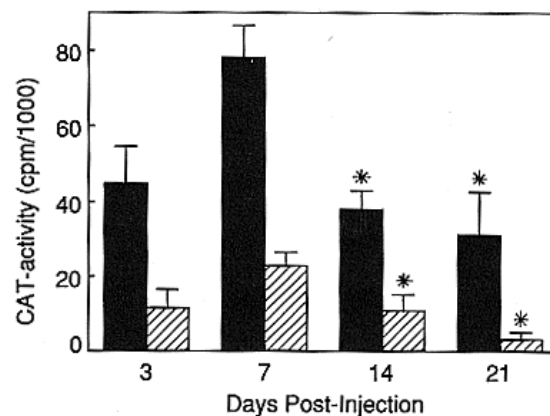


**Abbildung 2:** Balkendiagramm zum Vergleich von drei verschiedenen Injektionstechniken. Eine Gesamtmenge von 50  $\mu$ g -667- $\beta$ MHC-CAT wurde in jeder Gruppe injiziert. Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 10$  in jeder Gruppe).

*Promisköse und gewebspezifische Reporter-genkonstrukte werden über einen ausgedehnten Zeitraum exprimiert.*

Um die Stabilität und den Spitzenwert der Expression injizierter rekombinanter Genkonstrukte im Myokard von Hunden zu ermitteln, wurden Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der

Injektion getötet (3, 7, 14 und 21 Tage postoperativ). Hierbei wurde zwischen promiskösen (MSV-CAT) und gewebsspezifischen ( $\beta$ MHC-CAT) Konstrukten unterschieden (Abb. 3). ANOVA für CAT-Aktivität innerhalb der MSV-CAT, bzw. -667- $\beta$ MHC-CAT Gruppe war signifikant ( $p < 0.01$  jeweils). Das zeitabhängige Expressionsmuster war in beiden Gruppen vergleichbar, mit einer meßbaren CAT-Aktivität bereits 3 Tage nach der Injektion, einem Peak nach 7 Tagen und einer nachfolgenden Abnahme der Expression ( $p < 0.01$  für MSV-Promotor und  $p < 0.0001$  für  $\beta$ MHC-Promotor, ungepaarter t-Test). Dieses Expressionsmuster auf Proteinebene stellt sicherlich eine Überschätzung der tatsächlichen Genexpression dar, denn die Halbwertszeit von CAT beträgt allein ca. 50 Stunden in den meisten Zellen (Gorman et al., 1982). Deshalb reflektieren die Expressionswerte, wie sie in Abb. 3 dargestellt sind, nicht nur die transkriptionelle Regulation, sondern auch die Halbwertszeit des exprimierten Proteins sowie die der injizierten episomalen DNA.

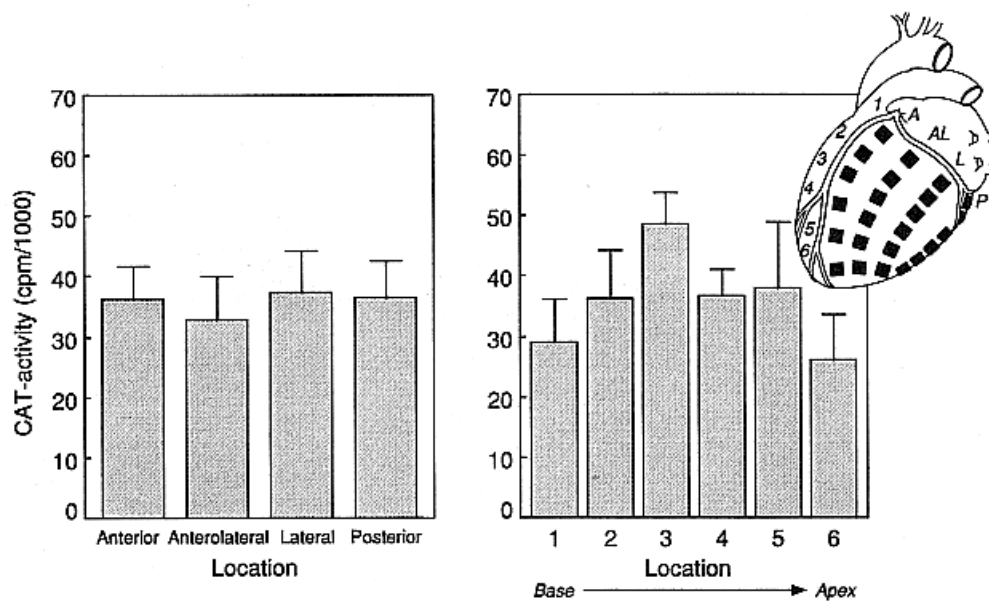


**Abbildung 3:** Balkendiagramm zur Darstellung des Zeitverlaufs der Expression injizierter Genkonstrukte. CAT-Aktivität aufgetragen gegen Zeit (Tage) nach Injektion für promisköse (MSV, schwarze Balken) und muskelspezifische (-667- $\beta$ MHC-CAT, schraffierte Balken) Promotoren (verglichen mit Tag 7, \* $p < 0.01$  für MSV und \* $p < 0.0001$  für -667- $\beta$ MHC-CAT nach ungepaartem t-Test). Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 5$  für jeden Zeitpunkt).

*Injizierte Reporter-genkonstrukte werden gleichermaßen über die linksventrikuläre Myokardwand exprimiert.*

Da es das Ziel dieser Arbeit war, ein praktisches Modell zu etablieren, das es erlaubt, die Expression verschiedener rekombinanter Genkonstrukte innerhalb desselben Individuums zu untersuchen, wurde nun die Expression eines bestimmten Konstruktes an verschiedenen Lokalisationen der linksventrikulären freien Myokardwand verglichen. Hierzu wurde -667- $\beta$ MHC-CAT an 24 verschiedenen Stellen des linken Ventrikels injiziert (Abb. 4). Zwischen diesen Lokalisationen waren keine Unterschiede in den Expressionswerten zu erkennen (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Aufgrund eines Trends etwas geringerer Expression im Bereich der Basis und des Apex des linken Ventrikels wurden

in darauffolgenden Experimenten an diesen Stellen keine Injektionen vorgenommen.



**Abbildung 4:** Balkendiagramm zur Darstellung der regionalen Expressionswerte injizierter Genkonstrukte über den linken Ventrikel verteilt. A = anterior, AL = anterolateral, L = lateral, P = posterior. 24 Injektionen von -667- $\beta$ MHC-CAT mit 4 Reihen um den linken Ventrikel wurden durchgeführt, mit jeweils 6 Injektionsstellen von der Basis zum Apex (siehe Zeichnung). Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 6).

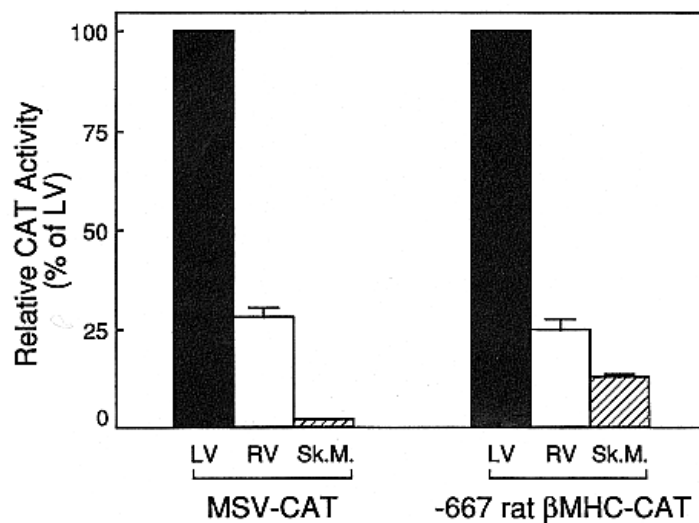
*CAT-Aktivität ist im linken Ventrikel etwa dreimal höher als im rechten Ventrikel*

Ein weiterer Vorteil des Hunde- versus des Nagermyokards ist die Möglichkeit, auch Injektionen in den rechten Ventrikel vorzunehmen. Wie in der Abbildung 5 dargestellt, so betrug die Expression promisköser als auch gewebspezifischer Promotorkonstrukte etwa ein Drittel im rechten Ventrikel gegenüber dem linken Ventrikel. Dies könnte auf der unterschiedlichen Wanddicke beruhen mit einer geringeren Anzahl von Zellen entlang dem Injektionskanal in der rechtsventrikulären Wand. Möglicherweise beruht dieser Unterschied aber auch auf der höheren Wahrscheinlichkeit, aufgrund der geringeren Wanddicke Plasmid-Lösung in die freie Herzhöhle zu verlieren.

*Das Myokard exprimiert injizierte Reportergenkonstrukte ein bis zwei Größenordnungen höher als der Skelettmuskel*

Um das Ausmaß der Expression zwischen dem Myokard und anderen Organen zu vergleichen und dadurch möglicherweise organspezifische Unterschiede der Expression exogener DNA festzustellen, injizierten wir promisköse (MSV-CAT) oder gewebspezifische ( $\beta$ MHC-CAT) Promotorkonstrukte in den M. quadriceps, einem Muskel mit gemischten Muskelfasertypen. Die in der Abbildung 5 dargestellten Werte sind dargestellt als Angabe des Prozentes der Expression desselben Konstruktes in der linksventrikulären Wand des Myokards. Beide Promotortypen wurden im Skelettmuskel ein bis zwei Größenordnungen geringer exprimiert als im Myokard. Der Grund für diesen gravierenden Unterschied ist unklar, zeigt aber, daß das Myokard besonders geeignet ist, mittels *in vivo*-Geninjektion die Regulation der Expression von Reportergenkonstrukten zu untersuchen.



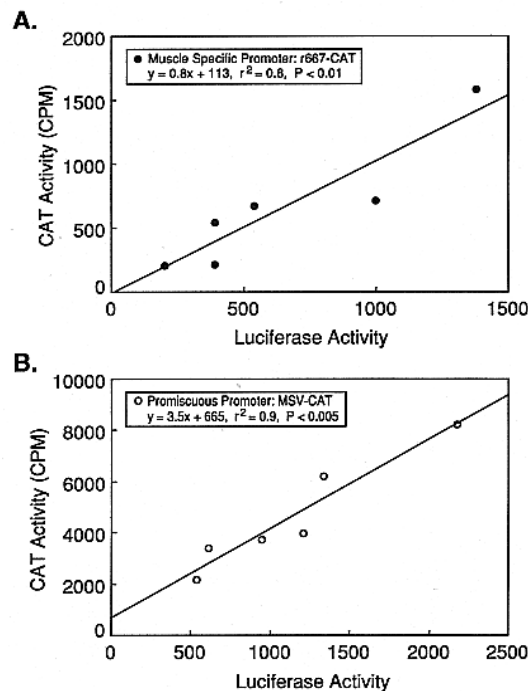


**Abbildung 5:** Balkendiagramm zur Darstellung der Expression promisköser (MSV-CAT) oder muskelspezifischer (-667-rβ-MHC-CAT) Promotorkonstrukte im rechten Ventrikel (RV) und im Skelettmuskel (Sk.M.). Die Angaben der Werte zeigen den Prozentwert der Expression im Vergleich zum linken Ventrikel an (100%, schwarze Balken). Weiße Balken für RV (n = 10 für MSV-CAT, n = 8 für -667-βMHC-CAT), schraffierte Balken für Sk.M. (n = 10 für MSV-CAT, n = 9 für -667-βMHC-CAT).

*Koinjektion eines Kontroll-Reportergenkonstruktes (RSV-Luciferase) erweist sich als sinnvoll, um für die Transfektionseffizienz zu kontrollieren.*

Kotransfektion wird bei *in vitro*-Transfektions-Assays verwandt, um für die Transfektionseffizienz zu kontrollieren. Aber auch bei *in vivo*-Modellen wird Kotransfektion angewandt (Kitsis et al., 1991; Parmacek et al., 1992). Seine Nützlichkeit hierfür wurde aber noch nie untersucht. Dabei wäre es aber von besonderer Bedeutung, da in *in vivo*-Modellen im Gegensatz zu Zellkultur-Modellen ein heterogener Zellpool vorliegt und dadurch - je nach Promotorkonstrukt - sehr unterschiedliche Expressionswerte resultieren könnten. Zwei repräsentative Experimente wurden auf die Korrelation zwischen CAT- und Luciferase-Werten in diesem Modell untersucht (Abb. 6). In einem Experiment war das muskelspezifische -667-βMHC-CAT-Konstrukt mit dem RSV-Luciferase-Konstrukt koinjiziert worden (Abb. 6A). Das LTR (long terminal repeat) des RSV-Promotors funktioniert wie ein promisköser Promotor in allen Geweben mesodermalen Ursprungs (Overbeck et al., 1986; Swain et al., 1987). Hier war die Korrelation zwischen den CAT- und den Luciferase-Werten signifikant ( $r^2 = 0.8$ , slope =  $0.8 \pm 0.2$ ,  $p < 0.01$ ). Wenn das promisköse MSV-CAT-Konstrukt mit RSV-Luciferase koinjiziert wurde, war die Korrelation zwischen den CAT- und den Luciferase-Werten ebenfalls signifikant ( $r^2 = 0.9$ , slope  $3.5 \pm 0.6$ ,  $p < 0.005$ ). Diese Daten belegen, daß die Koinjektion eines Reportergenkonstruktes sinnvoll und notwendig ist, um in einem *in vivo*-Modell der Geninjektion für die Transfektionseffizienz zu kontrollieren. Demnach können Unterschiede in der Expression verschiedener Reportergenkonstrukte auf eine unterschiedliche Regulation der Genexpression

zurückgeführt werden, solange die Werte für die Werte des koinjizierten Kontrollkonstruktes normalisiert werden. Diese Daten zeigen auch, daß ein promisköses Promotorkonstrukt mit gewebsspezifischen Konstrukten koinjiziert werden kann, um für die Transfektionseffizienz zu kontrollieren.

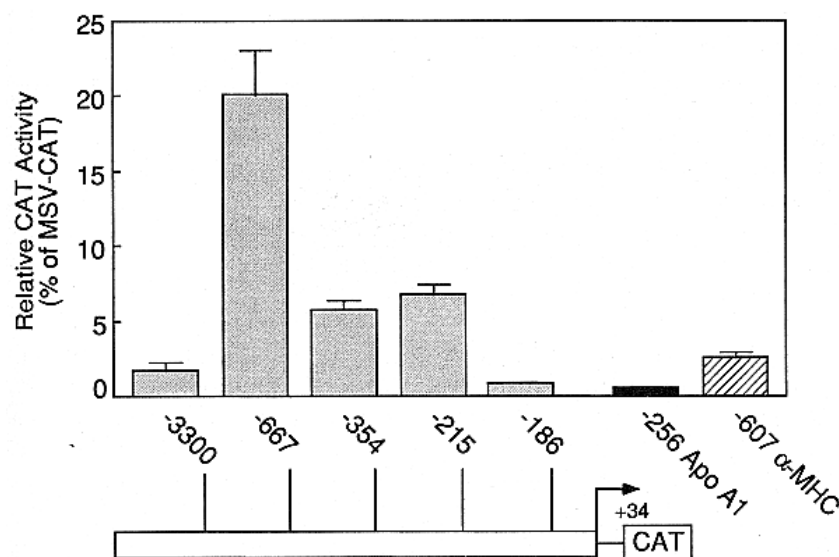


**Abbildung 6:** Korrelation zwischen CAT- und Luciferase-Aktivität in Koinjektionsexperimenten. Scatter-Plots der CAT-Aktivität versus Luciferase-Aktivität (Lichteinheiten) sind dargestellt. 100  $\mu$ g eines promiskösen (MSV-CAT, obere Abbildung) oder eines gewebsspezifischen (-667- $\beta$ MHC-CAT, untere Abbildung) Promotorkonstruktes wurden mit 20  $\mu$ g eines Kontrollgenkonstruktes (RSV-Luc) koinjiziert. Die Regressionsfunktionen sind angegeben.

*Injektion von Reporter-genkonstrukten ins Myokardium des Hundes ist ein nutzvolles Modell zur Identifizierung regulatorischer Gensequenzen in vivo.*

Nachdem all die wichtigen prinzipiellen Parameter, die die Expression injizierter Reporter-genkonstrukte im Myokard beeinflussen könnten, charakterisiert waren, wurde die Nützlichkeit dieses Modells für das *in vivo*-Promotor-"Mapping" und die Identifizierung regulatorischer Gensequenzen unter *in vivo*-Bedingungen überprüft. Hierzu wurden CAT-Reporter-genkonstrukte mit seriellen 5'-Deletionen des gewebsspezifischen  $\beta$ MHC-Promotors verwandt (Abb. 7). Als negative Kontrolle diente -256-ApoAI-CAT, das die Sequenz -256 bis +397 des Promotors des Apolipoprotein AI enthält und von dem eine leberspezifische Expression

nachgewiesen worden war (Widom et al., 1991). Die Aktivität der verschiedenen Deletionsmutanten des  $\beta$ MHC-Promotors wurde mittels ANOVA verglichen ( $p = 0.001$ ). Alle sechs möglichen paarweisen Vergleiche wurden durchgeführt und als signifikant erachtet ( $p < 0.005$ ), außer für -354- $\beta$ MHC-CAT versus -215- $\beta$ MHC-CAT. Die höchste Aktivität wies das Konstrukt -667- $\beta$ MHC-CAT auf. Der deutliche Aktivitätsunterschied dieses Konstruktes im Vergleich mit den übrigen Deletionsmutanten ist vereinbar mit der Existenz eines *Enhancer*-Elementes in der Region -667 bis -354 relativ zur Transkriptionsstartstelle. Die Deletion bis zur Stelle -186 (-186- $\beta$ MHC-CAT) führte zur nahezu vollständigen Auslöschung der Expression dieses  $\beta$ -MHC-Promotors mit Werten vergleichbar zu denen der Negativkontrolle (-256-ApoA1-CAT). Dies weist auf ein weiteres positives regulatorisches Element im Bereich zwischen -215 und -186 hin, das für die basale Transkription eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Möglicherweise befindet sich ein Repressor-Element weiter 5'-wärts, was die deutlich geringere Expression des -3300- $\beta$ MHC-CAT-Konstruktes gegenüber dem -354- oder -215- $\beta$ MHC-CAT-Konstrukt erklären würde. Das prädominierende Muster kontraktile Isoformen des Myokards des Hundes (vergleichbar zum Menschen hauptsächlich  $\beta$ MHC und nur geringe Anteile  $\alpha$ MHC) spiegelte sich auch in der unterschiedlichen Expression zwischen den vergleichbaren -667- $\beta$ MHC-CAT- und -607- $\alpha$ MHC-CAT-Konstrukten.



**Abbildung 7:** Balkendiagramm mit der Darstellung des Promotor-Mappings der 5'-flankierenden Region des  $\beta$ -MHC-Promotors. Eine Serie von Deletionen der Promotorregion von -3300 bis -186 wurden als CAT-Konstrukte ins Myokard injiziert. Die CAT-Werte wurden für die Expression des koinjizierten Kontrollreportergens (RSV-Luc) normalisiert. Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 6-10$ ).

Zusammenfassend stellen wir fest, daß diese Daten die Nützlichkeit der Injektion von Reportergenkonstrukten ins Myokard von Hunden belegen, um die Regulation der Genexpression *in vivo* zu untersuchen.

#### 2.1.4 Diskussion

Diese Untersuchung belegt, daß nackte Plasmid-DNA ins Hundemyokard ohne unerwünschte Nebeneffekte injiziert werden kann. Postoperativ über mehrere Tage ununterbrochen durchgeführtes elektrokardiographisches Monitoring und intraarterielle Blutdruckkontrollen in mehreren Hunden zeigten außer transienten Tachyarrhythmien in der ersten 1-2 Stunden postoperativ keine Nebenwirkungen der kardialen Injektionen. Weiterhin ist die Effizienz der Expression der injizierten Reportergene vergleichbar mit anderen *in vitro*-Transfektionsmodellen.

Die ersten Experimente adressieren wichtige Parameter der Injektionstechnik. Die Resultate belegen, daß die Expression der injizierten Konstrukte dosisabhängig erfolgt und oberhalb einer Konzentration von 200 µg einer Sättigungskinetik unterliegt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Injektion von Plasmid-DNA in den Skelettmuskel von Mäusen erzielt (Wolff et al., 1990). Die Analyse des Zeitverlaufs der Expression der injizierten Konstrukte ergab, daß sie mit Resultaten anderer Studien übereinstimmen, obwohl diese an kleinen Säugetieren durchgeführt worden waren (Buttrick et al., 1992; Wolff et al., 1990). Der genaue Grund für die Abnahme der CAT-Aktivität nach bereits 7 Tagen ist unklar, aber Acsadi et al. vermuten, daß injizierte Plasmid-DNA aufgrund ihrer episomalen Lokalisation relativ rasch degradiert wird (Acsadi et al., 1991). Alternativ wäre zu bedenken, daß eukaryote Zellen, die *in vivo* CAT exprimieren, aufgrund immunologischer Prozesse eliminiert werden. Diese Hypothese wird durch Experimente jüngerer Datums gestützt, die an immunsupprimierten Mäusen durchgeführt wurden und eine gegenüber normalen Tieren verlängerte Expression von Luciferase-Reportergenkonstrukten aufweisen (Acsadi et al., 1991). Ergebnisse von transgenen Tieren zeigen ebenfalls die Aktivierung immunologischer Prozesse durch die Expression von Transgenen (Tang et al., 1992). Dennoch, verschiedene Arbeiten konnten eine Expression bis zu 19 Monaten in Nagetieren nach Injektion von Plasmid-DNA in den Skelettmuskel (Wolff et al., 1992), bzw. bis zu 60 Tagen nach Injektion ins Myokard von Ratten (Buttrick et al., 1992) nachweisen.

Die Möglichkeit lokaler Unterschiede in der Expression ins Myokard injizierter Reportergenkonstrukte war bisher nicht untersucht worden, hauptsächlich aufgrund der geringen Größe der verwandten Spezies. In der vorliegenden Arbeit fanden wir keine regionalen Unterschiede in der Expression injizierter Reportergenkonstrukte. Dies bedeutet die Möglichkeit der Injektion mehrerer Konstrukte in ein Herz, was ein Vorteil gegenüber kleineren Versuchstieren bedeutet, bei denen eine große Anzahl von Tieren erforderlich ist, um statistische Signifikanz zu erreichen (Wolff et al., 1991).

Die histologische Zuordnung der Expression injizierter Reportergenkonstrukte wurde entweder durch Bestimmung der Expression in verschiedenen Arealen um die Injektionsstelle erreicht (Buttrick et al., 1992), oder erfolgte durch Anwendung von Konstrukten, die die kodierende Sequenz des lacZ Gens von *Escherichia coli* enthalten (Acsadi et al., 1991; Lin et al., 1990). Demnach werden wohl

ausschließlich Zellen transfiziert, die sich in der unmittelbaren Umgebung des Injektionskanals befinden. Diese Beobachtung führte zu Gedanken über den möglichen Aufnahmemechanismus injizierter Plasmid-DNA in die Zellen und führte zu der Favourisierung der DNA-Aufnahme durch physikalische Verletzung der Zellmembran durch die Injektionsnadel als Voraussetzung für den DNA-Transfer ins Zellinnere. Die hier vorgelegten Ergebnisse sind allerdings nicht in Übereinstimmung mit dieser Hypothese. Drei verschiedene Injektionstechniken mit jeweils unterschiedlichem Ausmaß an Gewebstrauma führten zu keinen erkennbaren Unterschieden in der DNA-Aufnahme, bzw. -Expression. Da die Expressionmuster der injizierten Reportergenkonstrukte deutlich gewebsspezifische Regulation erkennen lassen (Abb. 7), ist es unwahrscheinlich, daß die Expression von Makrophagen resultiert, die durch die lokale Gewebsreaktion nach Injektion an den Ort der DNA-Applizierung gewandert sind. Dennoch bleibt der genaue Mechanismus der Aufnahme injizierter Plasmid-DNA unklar.

Sowohl promisköse, als auch gewebsspezifische Promotorkonstrukte wurden im Skelettmuskel deutlich geringer als im Myokard exprimiert. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit einer anderen Arbeit, in der eine etwa 20-fach geringere Expression von RSV-Luciferase im Skelettmuskel der Ratte im Vergleich zum Myokard beobachtet werden konnte (Kitsis et al., 1991). Der Grund hierfür ist unklar und Grundlage für Spekulationen. So könnte beispielsweise die rhythmische Kontraktion des Myokards mit der einhergehenden Veränderung der Wandspannung oder andere neurohumorale regionale Unterschiede als Erklärung für diese organspezifischen Unterschiede dienen. Auch der Unterschied in der Struktur zwischen dem Tubulussystem des Skelettmuskels und dem Myokard könnte unterschiedliche Effizienz der Aufnahme der Plasmid-DNA bedeuten. Bezüglich der Expression des gewebsspezifischen  $\beta$ MHC-Konstruktes wäre auch der Unterschied des jeweiligen intrazellulären Vorkommens dieses kontraktile Proteins eine mögliche Erklärung für unterschiedliche Expressionswerte (Izumo et al., 1986). Jedenfalls sind noch weitere Arbeiten in dieser Richtung erforderlich, um diese Frage endgültig zu klären.

Die Ergebnisse des Promotor-"Mappings" durch *in vivo*-Geninjektion ins Myokard sind in Übereinstimmung mit Transfektions-Assays von Zellkulturen mit Herzmuskel- oder Skelettmuskelzellen (Thompson et al., 1991) und belegen die Nützlichkeit dieses Modells für die Identifizierung regulatorischer Gensequenzen unter physiologischen *in vivo*-Bedingungen und möglicherweise die Anwendung dieses Modells zur Untersuchung der Regulation der Genexpression unter pathophysiologischen Bedingungen.

## **2.2 Identifizierung des *cis*-regulatorischen Elements, das die Induktion des ANF-Gens bei der Myokardhypertrophie vermittelt**

### **2.2.1 Einleitung**

Hypertrophie des Myokards ist der primäre kompensatorische Mechanismus auf verstärkte hämodynamische Belastung, jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch weitgehend

unklar. Es ist anzunehmen, daß ein besseres Verständnis dieser Prozesse durch Studien gewonnen werden kann, die sich mit molekularen Mechanismen der initialen Antwort des Myokards auf die Druck- oder Volumenbelastung beschäftigen. Das Gen des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) ist in der Vergangenheit extensiv untersucht worden und wird bekannterweise bei Myokardhypertrophie induziert. Während der embryonalen Entwicklung wird das ANF-Gen sowohl in den Vorhöfen, als auch in den Ventrikeln des Herzens exprimiert (Bloch et al., 1986). Kurz nach der Geburt wird die Expression in den Ventrikeln herunterreguliert und die Vorhöfe bleiben der primäre Ort der kardialen ANF-Synthese des differenzierten Myokards (Wu et al., 1988). Induktion einer ventrikulären Hypertrophie ist charakterisiert durch die Reexpression von ANF in ventrikulären Zellen als Merkmal einer Aktivierung eines embryonalen Genexpressionsprogramms im hypertrophierenden Myokard (Arai et al., 1988; Drexler et al., 1989; Edwards et al., 1988; Lee et al., 1988). Die Induktion der ANF-Expression ist ein hoch konserviertes Merkmal der Myokardhypertrophie und kann in einer Vielzahl verschiedener Spezies beobachtet werden wie bei der Maus, der Ratte, Hamstern, Hunden und Menschen (Drexler et al., 1989; Edwards et al., 1988; Hasebe et al., 1995; Izumo et al., 1988; Knowlton et al., 1995; Rascher et al., 1985). Verschiedene Stimuli zeichnen sich dafür verantwortlich einschließlich verschiedener Hormone, genetische Prädisposition, arterielle Hypertonie und Druck- und Volumenbelastung (Arai et al., 1988; Drexler et al., 1989; Edwards et al., 1988; Hasebe et al., 1995; Lee et al., 1988).

Versuche wurden bereits unternommen, die *cis*-agierenden regulatorischen Elemente, die für die Induktion der *Immediate Early Genes* und embryonaler Gene - einschließlich des ANF-Gens - bei der Myokardhypertrophie verantwortlich sind. Viele dieser Studien waren auf transiente Transfektions-Assays kultivierter kardialer Zellen beschränkt (Kariya et al., 1993; Kariya et al., 1994; Matsubara et al., 1988; McBride et al., 1993; Sadoshima and Izumo, 1993; Simpson, 1983; von Harsdorf et al., 1988; von Harsdorf et al., 1989; Zhu et al., 1991). Darauf basieren Spekulationen, daß die transiente Aktivierung verschiedener Proto-Onkogene, wie sie bei der Induktion der Myokardhypertrophie beobachtet werden kann, in die Aktivierung von Genen wie dem des ANF's involviert sein könnte (Izumo et al., 1988; Rosenzweig et al., 1991). Allerdings stellen weder isolierte primäre Kardiomyozytenpräparationen, noch die isolierte *working heart*-Präparation ein geeignetes Modell zur Untersuchung der molekularen Prozesse, die zur Ausbildung der Myokardhypertrophie führen, dar. Die wiederholte Beobachtung der Induktion der ANF mRNA von normalerweise nicht nachweisbaren Konzentrationen bei normalem Myokard zu deutlich meßbaren Konzentrationen bei der Myokardhypertrophie legt nahe, daß transkriptionelle Prozesse dabei eine entscheidende Rolle spielen.

Im folgenden Abschnitt der Arbeit wurde deshalb das unter 2.1. beschriebene Modell benutzt, bei dem Plasmid-DNA intrakardial injiziert wird, um *cis*-agierende Elemente im ANF-Gen zu identifizieren, die für die Induktion dieses Genes bei Myokardhypertrophie verantwortlich sind. Ein besonderes Merkmal dieser Arbeit ist die Verwendung eines Tiermodells mit einer Methode der

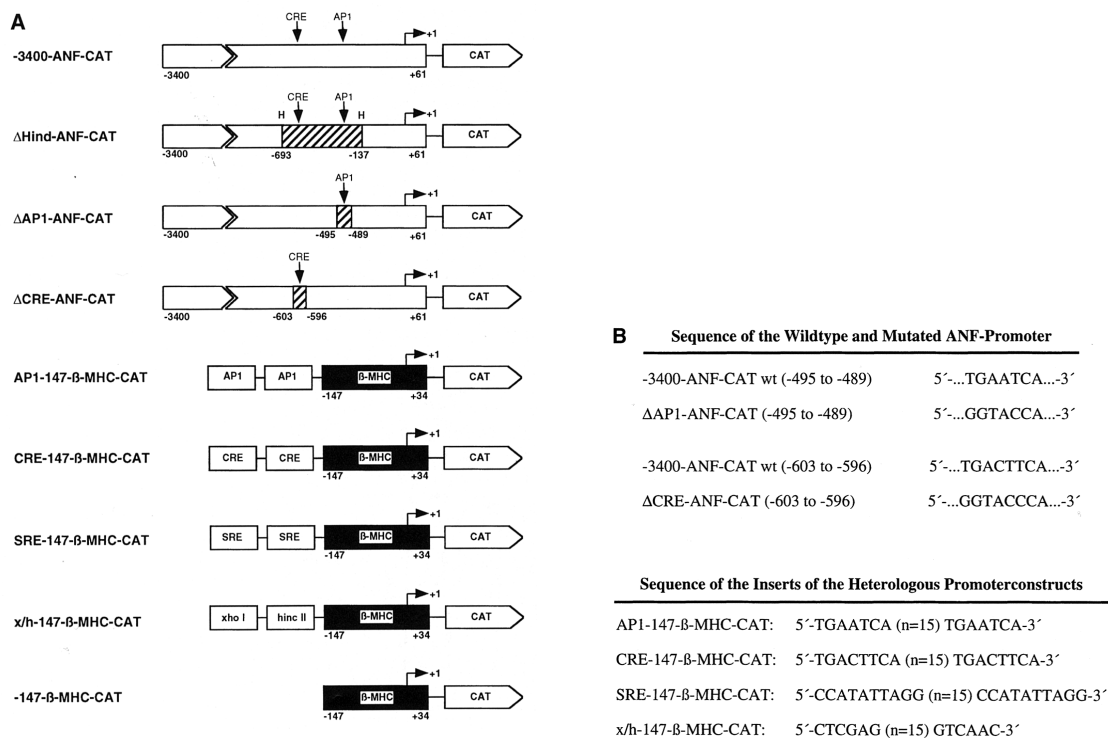
Induktion akuter Druckhypertrophie bei großen Säugetieren. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da sich kleine und große Säuger hinsichtlich der biochemischen und hämodynamischen Eigenschaften des Myokards teils erheblich unterscheiden. Durch Injektion von Plasmid-DNA direkt ins Myokard sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. ist die Expression von ANF durch Druckhypertrophie aktivierbar?
2. welches ist das *cis*-agierende regulatorische Element, das die Induktion des ANF-Gens bei der Druckhypertrophie vermittelt?
3. ist das entsprechende *cis*-regulatorische Element in der Lage, die Induzierbarkeit auf einen heterologen Promotor zu übertragen?

### 2.2.2 Methoden

#### *Reporter-gen-Plasmide*

Die neben den unter 2.1.2 beschriebenen Reporter-gen-Plasmiden in dieser Arbeit verwandten Konstrukte sind in Abbildung 8 dargestellt. -3400-ANF-CAT wurde von Frau Dr. Christine Seidman (Boston, U.S.A.) freundlicherweise zur Verfügung gestellt und enthält die 5'-flankierende Region des ANF-Promotors der Ratte, die von der Nukleotidsequenz -3400 bis zu +61 reicht und in die BamHI-Stelle des pO-CAT Vektors kloniert wurde (Seidman et al., 1988). Hind-ANF-CAT wurde durch eine Deletion eines 556 bp HindIII-Fragmentes (Nukleotidsequenz -693 bis -137) des -3400-ANF-CAT Konstruktes hergestellt. DAP1-ANF-CAT enthält eine AP1-Stelle (Position -496 bis -489), die von 5'-ATGAATCA-3' zu 5'-AGGTACCT-3' (Sequenz des *sense*-Stranges) mutiert wurde, wodurch eine singuläre KpnI Restriktionsstelle in den ANF-Promotor eingeführt wurde. ΔCRE-ANF-CAT wurde hergestellt durch Mutation des *cAMP regulatory element* (CRE) des ANF-Promotors (Position -602 bis -596) von 5'-TGACTTCA-3' zu 5'-TGGTACCG-3' (Sequenz des *sense*-Stranges), wodurch ebenfalls eine singuläre KpnI-Stelle in den ANF-Promotor eingeführt wurde.



**Abbildung 8:** **A**, Schema der verschiedenen Promotorkonstrukte: Wild-Typ (-3400-ANF-CAT), Deletion ( $\Delta$ Hind-ANF-CAT) und Mutation ( $\Delta$ AP1-ANF-CAT und  $\Delta$ CRE-ANF-CAT) des ANF-Promotors und die heterologen Promotorkonstrukte. H, HindIII-Schnittstelle. Schraffierte Bereiche: deletierte und mutierte Sequenzen. Schwarze Bereiche:  $\beta$ MHC-Promotorsequenzen. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Nukleotidposition relativ zur Transkriptionsstartstelle. **B**. Aktuelle Sequenzen des Wildtyps und des mutierten ANF-Promotorkonstruktes (*sense*-Strang) an den angegebenen Stellen des ANF-Promotors, in die eine singuläre KpnI-Schnittstelle eingeführt wurde, sowie Darstellung der Sequenz der heterologen Promotorkonstrukte (*sense*-Strang). n = 15, ist eine zufällige Sequenz von 15 Nukleotiden (5'-TTAAATTTGAGAAAG-3'), die die beiden regulatorischen Elemente trennte.

Die heterologen Promotorkonstrukte wurden durch die Insertion synthetisch hergestellter doppelsträngiger Oligonukleotide (Applied Biosystems) konstruiert, die die jeweiligen regulatorischen Elemente *in tandem* enthielten, inseriert in die Polylinkerregion oberhalb des  $\beta$ MHC-Fragmentes des -147- $\beta$ MHC-CAT Plasmids, das den basalen Promotor (Sequenz -147 bis +34) des Rattengens der  $\beta$ MHC fusioniert mit dem CAT-Gen des pO-CAT Vektors enthält. AP1-147- $\beta$ MHC-CAT enthält die ANF-AP1-Stelle (5'-ATGAATCA-3') *in tandem* separiert durch 15 zufällige Nukleotide (die identische zufällige Nukleotidsequenz 5'-TTAAATTTGAGAAAG-3' wurde in allen heterologen Promotorkonstrukten zwischen den *in tandem* inserierten Bindungsstellen verwandt) inseriert in eine SphI-Restriktionsstelle des Polylinkers oberhalb des -147- $\beta$ MHC-Fragmentes. CRE-147- $\beta$ MHC-CAT enthält die CRE-Sequenz des Ratten-ANF-Promotors (5'-TGACTTCA-3') *in tandem* separiert durch die genannten 15 zufälligen Nukleotide und inseriert in das -147- $\beta$ MHC-Promotorkonstrukt an der gleichen Stelle wie die ANF-AP1-Sequenz. SRE-147- $\beta$ MHC-CAT enthält die SRE-Sequenz des c-fos Promotors der Maus (5'-CCATATTAGG-3') (Grueneberg et al., 1992),



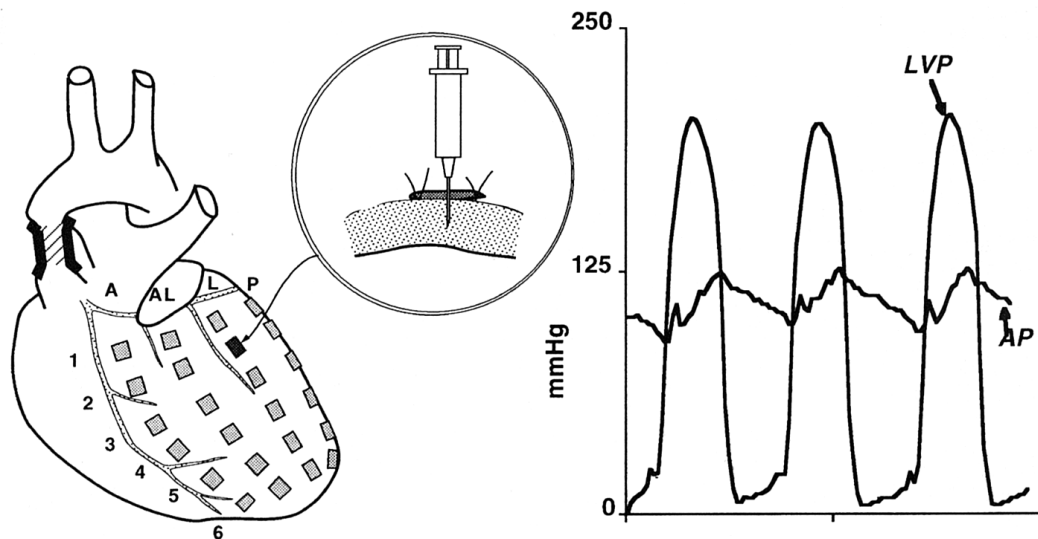
ebenfalls *in tandem* separiert durch die 15 zufälligen Nukleotide und ebenfalls in die SphI-Stelle des Polylinkers des -147- $\beta$ MHC-CAT Konstruktes inseriert. x/h-147- $\beta$ MHC-CAT enthält eine XhoI- und eine HincII-Restriktionsstelle separiert durch die gleichen 15 zufälligen Nukleotide, inseriert wieder in die SphI-Stelle des Polylinkers des -147- $\beta$ MHC-CAT Konstruktes.

#### *Gezielte Mutagenese mittels PCR*

Die Mutationen relevanter regulatorischer Elemente des ANF-Promotors (AP1-, CRE-Element) wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Die Reaktion wurde durchgeführt mit dem herausgeschnittenen 556 bp messenden HindIII-Fragment des -3400-ANF- Promotors als Reaktionsschablone, das sowohl die AP1-, als auch die CRE-Bindungsstelle enthielt. Die PCR wurde durchgeführt in einem Perkin Elmer Gene Amp. 9600 Apparat über 25 Zyklen mit den Reaktionsbedingungen bei 94° Celsius für 1 Minute, 55° Celsius für 1 Minute und 65° Celsius für 30 Sekunden. Die Konstruktion wurde in zwei PCR-Schritten durchgeführt. Zunächst wurde die 5'-flankierende Sequenz neben der AP1-, bzw. CRE-Stelle amplifiziert unter Verwendung eines Vorwärts-Primers, der eine flankierende HindIII-Schnittstelle enthielt, und einem Revers-Primer, der eine flankierende KpnI-Schnittstelle enthielt. Dann wurde die 3'-flankierende Sequenz in direkter Nachbarschaft zu den jeweiligen regulatorischen Sequenzen amplifiziert, wobei ein Vorwärts-Primer mit einer KpnI-Schnittstelle und ein Revers-Primer mit einer HindIII-Schnittstelle verwandt wurde. Nach Verdau der PCR-Produkte mit KpnI wurden beide Produkte ligiert und formten nun ein 556 bp-Fragment, das homolog war zum ANF 556-HindIII-Fragment mit Ausnahme einer singulären KpnI-Schnittstelle anstelle der jeweiligen regulatorischen Elemente. Das Ligationsprodukt wurde mit HindIII verdaut und in die HindIII-Stelle des -3400-ANF-Promotorkonstruktes reinseriert. Die Richtigkeit der Sequenz dieser Konstrukte wurde mittels Sequenz-Analyse bestätigt.

#### *Präparation der Tiere, Erzeugung eines Druckgradienten, Injektion der Plasmid-DNA*

Hunde wurden präpariert wie unter 2.1.2 beschrieben. Nach den Injektionen wurde die Wunde verschlossen (Sham-operierter Gruppe). In der Gruppe mit Induktion einer Druckbelastung wurde direkt nach Injektion der Plasmid-DNA ein Druckgradient in der *aorta ascendens* durch Anschlingen mit einer Teflon-Bandage erzeugt. Proximal und distal der Bandage wurde der Druck über einen an einen Druckaufnehmer (Transducer von Statham Instruments) angeschlossenen Katheter invasiv gemessen. Durch leichtes Anziehen der Bandage wurde ein Druckgradient von  $59 \pm 5.8$  mmHg intraoperativ eingestellt (siehe Abb. 9). Nach der Operation wurden die Tiere für eine Weile in einem Aufwachraum observiert. Die Tiere vertrugen den Eingriff gut und Blutdruck, Puls und aortaler Gradient wurden täglich bestimmt.



**Abbildung 9:** Darstellung der Technik der intrakardialen Geninjektion mit *aortic banding* und des ventrikulo-aortalen Gradienten eines chronisch instrumentierten Hundes 1 Woche nach Operation (der Gradient betrug ca. 90mmHg).

#### *Präparation des Gewebes, CAT-Assay, und Luciferase-Assay*

Diese Schritte erfolgten wie unter 2.1.2 beschrieben.

#### *Präparation nukleärer Extrakte*

Gewebsproben von 8 Hundeherzen (vier sham-operierte und vier mit 7 Tagen Druckbelastung) wurden präpariert wie von Deryckere und Gannon beschrieben (Deryckere and Gannon, 1994).

#### *Proben*

Die Sequenz der Proben zur Verwendung in der *Gel-Shift-Analyse* (GMSA) stammen alle von der 5'-flankierenden Region (-506 bis -483) des ANF-Promotors ab (EMBL/GenBank/DDBJ Zugangs-No. J03267). Die verwandten Proben wurden aus einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt, die durch Hybridisierung doppelsträngig gemacht wurden und deren Enden mit Klenow-Fragmenten gefüllt wurden. Mittels T4-Polynukleotid-Kinase wurden die Proben radioaktiv markiert. Im Nachfolgenden werden die Wildtyp-ANF-Sequenzen in Großbuchstaben dargestellt. Klein geschriebene fette Buchstaben signalisieren Nukleotidveränderungen innerhalb der mutierten Proben und der AP1-Konversions-Probe. Die AP1-Konsensus-Probe wurde bei Santa Cruz Biotechnology erworben. Die Sense-Sequenzen waren folgendermaßen:

ANF-Probe: 5'-gatctACGAGGCCAATGAATCAGGTGTGActaga-3';

mutierte Probe: 5'-gatctACGAGGCCAAGtAcCaGGTGTGActaga-3';

AP1-Konversions-Probe: 5'-gatctACGAGGCCAATGAcTCAGGTGTGActaga-3';

AP1-Konsensus-Probe: 5'-cgctggATGACTCAgccgaa-3'.

### *Gel-Shift-Assay (GMSA)*

Die Assay-Bedingungen wurden erarbeitet, um optimale Bindung für beide Proben - die ANF-Probe und die AP1-Konsensus-Probe - zu erreichen und lehnen sich an andere Arbeiten an, die GMSA mit AP1-Proben durchgeführt haben (Allegretto et al., 1990; Argentin et al., 1994; Nakabeppu et al., 1988; Rauscher et al., 1988; Rosenzweig et al., 1991). Der Bindungspuffer bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 5 mM DTT, 0,5 mM EDTA und 5% Glycerol. Die auf Eis aufgetauten Kernextrakte wurden mit dem Bindungspuffer gemischt, 200 ng polyIdC zugegeben und in einem Endvolumen von 20 µl bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nun wurde die radioaktiv markierte Probe zugegeben und das Gemisch für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Davon wurden nun 15 µl auf ein 4%-Polyacrylamid-Gel geladen (0,5 x TBE). Danach wurden die Gele vakuumgetrocknet und einem Kodak-Film exponiert. Bei den Konkurrenzexperimenten wurde die unmarkierte Kompetitor-Probe direkt vor Zugabe der markierten Proben dem Gemisch zugegeben. Für die *Supershift*-Experimente wurden Antikörper verwendet, die spezifische konservierte Epitope der jeweiligen Protein-Familie von Jun (SC-44X, Santa Cruz) oder Fos (SC-47X, Santa Cruz) erkennen. 10 Minuten nach Inkubation mit der markierten Probe wurden 4 µg des jeweiligen Antikörpers (oder Präimmun-Serum) zugegeben und das Gemisch wurde nun bei 4° Celsius für weitere 4 Stunden inkubiert, bevor es auf das Gel geladen wurde. In den Experimenten, in denen der Antikörper peptid-neutralisiert wurde, wurde der Antikörper mit dem Peptid (SC-44P, Santa Cruz) über Nacht bei 4° Celsius inkubiert.

### *Experimentelles Design und Datenanalyse*

10 erwachsene Mischlinge mit einem Gewicht von 22-26 kg wurden für die Injektionsexperimente benötigt. Sie wurden 2 Gruppen mit jeweils 5 Hunden zugeordnet, davon erhielt eine Gruppe *aortic banding*, die andere Gruppe wurde sham-operiert. Die Injektionen wurden jedesmal in einem Paar von Hunden vorgenommen (1 x sham-operiert und 1 x *aortic banding*) und die Ergebnisse direkt miteinander verglichen. In jedem Experiment wurde das -3400-ANF-CAT Konstrukt als Positivkontrolle injiziert. Die Daten werden angegeben als CAT/Luciferase Verhältnis, um für die Injektionseffizienz zu kontrollieren. Das *n* bezieht sich auf die Anzahl der Injektionen eines jeweiligen Konstruktes pro Tier. Die Variabilität der Expressionswerte betrug 15% in beiden Gruppen (gemessen an den Werten von -3400-ANF-CAT).

#### 2.2.3 Ergebnisse

##### *Tiermodell der akuten Druckhypertrophie*

Die Plasmid-DNA wurde intraoperativ in Hundeherzen injiziert und direkt anschließend ein aortaler Gradient durch die Verengung der *aorta ascendens* mittels einer Teflon-Bandage (*aortic banding*) erzeugt. Jedes Tier erhielt 20-28 intrakardiale Injektionen in den linken Ventrikel. Die Tiere wurden

nach 7 Tagen getötet und die markierten Injektionsstellen wurden auf die Expression des injizierten Plasmids untersucht. Serielles hämodynamisches Monitoring erfaßte die Aufrechterhaltung des linksventrikulären/aortalen Gradienten, der nach 7 Tagen ca. 98 mmHg betrug. Abbildung 9 zeigt ein Beispiel hierfür. Dieses Modell zeichnet sich dadurch aus, daß trotz des kontinuierlichen Gradienten keine sichtbaren Zeichen einer linksventrikulären Hypertrophie im Zeitraum von 7 Tagen entstehen (z.B. unverändertes Verhältnis von linkem Ventrikel/Körpergewicht; siehe Tabelle 1). Dies war insofern erwünscht, als es das Ziel der Untersuchung war, regulatorische Mechanismen zu identifizieren, die nicht die Konsequenz, sondern vielmehr die Ursache der Entwicklung einer morphologisch und funktionell manifesten linksventrikulären Hypertrophie darstellen.

*Table I. Hemodynamics and Morphology*

	Sham		Pressure overload	
		<i>n</i>		<i>n</i>
Left ventricular				
systolic pressure (mmHg)	125	2	214±5.9	7
Aortic systolic pressure (mmHg)	123	2	116±6.1	7
Mean aortic pressure (mmHg)	103	2	96±4.9	7
Left ventricular/				
aortic gradient (mmHg)	2	2	98±5.2	7
Body weight (kg)	23.7±1.1	5	24.3±0.6	5
Left ventricular weight (g)	115.4±12.4	5	123±10.3	5
Left ventricular weight/				
body weight (g/kg)	4.89±0.52	5	5.10±0.50	5

**Tabelle 1:** Hämodynamik und Morphologie

*Injizierte ANF-Reportergenkonstrukte werden im Myokard mit akuter Druckhypertrophie transaktiviert.*

Promotorkonstrukte mit konstitutiv aktiven viralen Promotoren (MSV-CAT oder RSV-Luc) wurden in hohem Maße sowohl in normalem, als auch in hypertrophierendem Myokard exprimiert (siehe Tabelle 2).

*Table II.*

	Sham	Pressure overload
CAT/Luc×100		
MSV-CAT	1936±58	1705±123
ApoA1-CAT	8±1	10±1
-3400-ANF-CAT	40±3	235±6*
-667-β-MHC-CAT	290±17	345±8

\*Significantly different.

**Tabelle 2:** Relative Expression von verschiedenen Reportergenkonstrukten in sham-operierten Hunden und Hunden mit *aortic banding*. Experimentelles Design ist unter Methoden beschrieben.

Das Ausmaß der Expression wurde durch die Druckhypertrophie nicht beeinflusst (CAT/Luc Verhältnis). Hierbei wurde RSV-Luc mit allen CAT-Reportergenkonstrukten als interne Kontrolle koinjiziert. Als negative Kontrolle wurde -256ApoAI-CAT injiziert. Dieses Promotorkonstrukt enthält den leberspezifischen basalen Promotor des Apolipoprotein I Gens. Das -667- $\beta$ MHC-CAT Konstrukt wurde sowohl in normalen, sham-operierten, als auch in Herzen mit akuter Druckhypertrophie hoch exprimiert. Das ANF-Promotor Konstrukt mit der gesamten Promotorsequenz (-3400-ANF-CAT) wurde im normalen Myokard sehr gering exprimiert. In der Gruppe mit *aortic banding* kam es allerdings zu einem 6-fachen Anstieg der Expression des ANF-Konstruktes (siehe Abb. 10A).

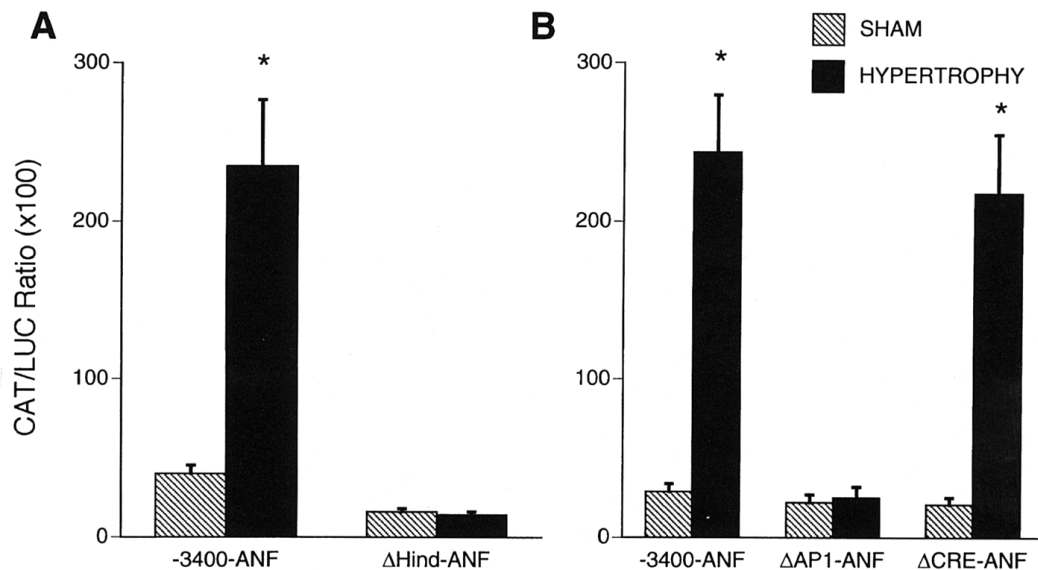
*Die Induktion des ANF-Gens wird vermittelt durch ein regulatorisches Element innerhalb einer 556 Basenpaare umspannenden Region.*

In transienten Transfektions-Assays von Zellkulturen mit neonatalen Kardiomyozyten war gezeigt worden, daß ein 556 Basenpaare langes Segment des Promotors für die basale ANF Expression nötig ist (Rosenzweig et al., 1991). Dieses Segment scheint auch für die Induktion des ANF-Gens bei Druckhypertrophie verantwortlich zu sein, da ein Konstrukt, das eine Deletion dieses 556 Basenpaare langen Fragmentes des ANF-Promotors enthält ( $\Delta$ Hind-ANF), durch *aortic banding* nicht induzierbar war. Wie bereits in Transfektions-Assays neonataler Rattenkardiomyozyten gezeigt worden war, so kam es durch diese Deletion auch in dem hier angewandten Modell zu einer Reduktion der basalen Expression des ANF-Promotors in sham-operierten Tieren. Da bereits die Deletion dieser 556 Basenpaare zu einer kompletten Aufhebung der Induzierbarkeit durch Druckhypertrophie verursachte, wurde keine weitere detaillierte Analyse des ANF-Promotors durchgeführt. Zusammenfassend scheint diese 556 Basenpaare umfassende Sequenz des ANF-Promotors ein regulatorische Elemente zu enthalten, die sowohl für die basale, als auch für die induzierbare Expression des ANF-Gens von Bedeutung sind.

*Das ANF-AP1 Element ist essentiell für Induktion des ANF-Gens durch Druckhypertrophie.*

Das identifizierte 556 Basenpaare-Segment enthält zwei Kandidatenelemente, die für die Induktion des ANF-Gens durch Druckhypertrophie potentiell in Frage kommen. Dies ist eine AP1 ähnliche Bindungsstelle (ATGAATCA: -496 bis -489) und ein *cAMP responsive element* (CRE) (TGACTTCA: -602 bis -596). Die ANF-AP1 Stelle unterscheidet sich von der AP1 Konsensussequenz lediglich durch ein einziges Nukleotid. Es wurden nun Reportergenkonstrukte hergestellt, die mittels gezielter Mutagenese Punktmutationen entweder der AP1 Stelle, oder des CRE enthielten. Wie der Abb. 10B zu entnehmen ist, führte keiner der Mutationen zu einer Beeinträchtigung der basalen Expression der ANF-Promotorkonstrukte. Nach 7 Tagen Druckhypertrophie zeigte sich allerdings, daß das ANF-Promotorkonstrukt, das eine Mutation des CRE enthielt, 11-fach induziert wurde, während das mit

der Mutation der AP1 Stelle nicht induzierbar war. Diese Ergebnisse zeigen, daß die ANF-AP1 Bindungsstelle für die Induzierbarkeit des ANF-Gens bei Druckhypertrophie eine zentrale Rolle zu spielen scheint.



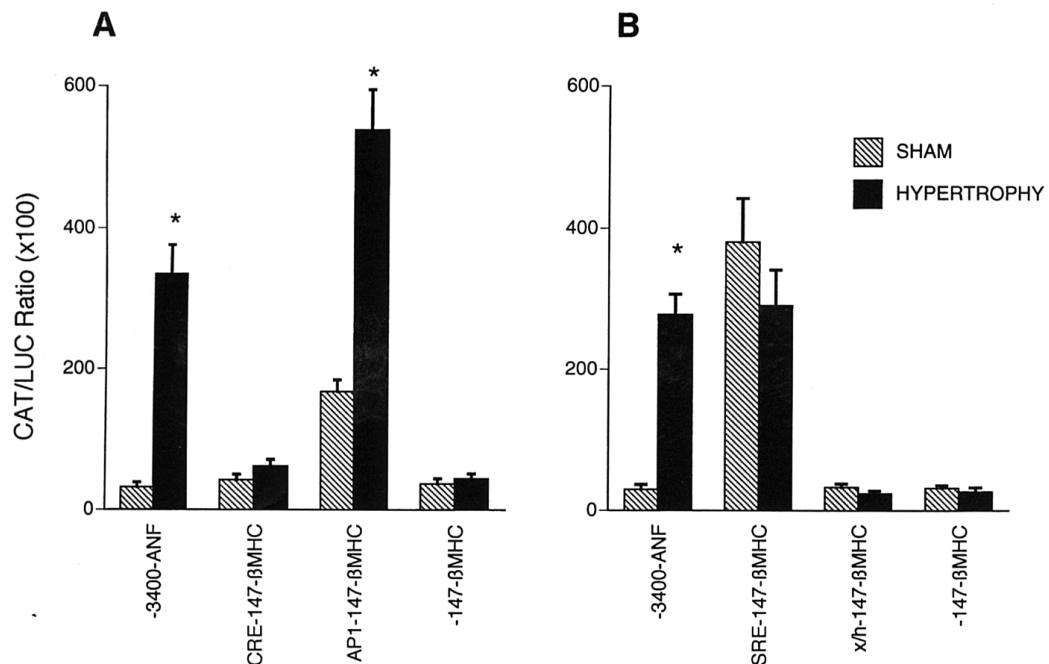
**Abbildung 10:** Einfluß der Druckbelastung auf die Expression von ANF-Reporterkonstrukten. **A**, Expression von CAT-Konstrukten mit dem ANF-Promotor-Wildtyp (-3400-ANF) oder einer Deletion eines 556 Basenpaare langen HindIII-Fragmentes ( $\Delta$ Hind-ANF). **B**, Effekt gezielter Mutagenese auf die ANF-Reporterexpression unter Druckbelastung. Wildtyp (-3400-ANF), ANF-Promotor mit Mutation der AP1-Stelle ( $\Delta$ AP1-ANF) oder der CRE-Stelle ( $\Delta$ CRE-ANF). CAT-Werte wurden für die entsprechenden Luciferase-Werte derselben Injektionsstelle normalisiert (CAT/Luc ratio  $\times$  100). Druckbelastung (schwarze Balken), sham-operiert (schraffierte Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 10 für jedes Konstrukt). \*, signifikanter Unterschied zur Sham-Gruppe.

Um die Hypothese zu überprüfen, ob das AP1-Element ausreichend ist, das ANF-Gen zu induzieren, wurden heterologe Promotorkonstrukte hergestellt, die den basalen Promotor des  $\beta$ -MHC Gens enthielten, der genügend Sequenz enthielt, um eine muskelspezifische Expression, aber keine Induktion durch Druckhypertrophie zu vermitteln (147- $\beta$ MHC-CAT). Wie der Abbildung 11A zu entnehmen ist, so konnte die hypertrophie-bedingte Induktion des ANF-Promotors durch die AP1-Bindungsstelle, nicht aber durch das CRE auf den basalen  $\beta$ MHC-Promotor übertragen werden. Bemerkenswerterweise wurde das AP1-147- $\beta$ MHC-CAT Konstrukt auch in den sham-operierten Tieren signifikant induziert, was für eine gewisse Induzierbarkeit dieses Konstruktes unabhängig von der Induktion der Myokardhypertrophie spricht. Diese basale Induzierbarkeit ist möglicherweise auf eine funktionelle Interaktion zwischen der AP1-Stelle und dem basalen  $\beta$ MHC-Promotor zurückzuführen, die eine Erleichterung der basalen Transkription verursacht. Dieser Effekt wurde allerdings durch die Druckhypertrophie erheblich gesteigert.

Um jede Form der unspezifischen Induktion der basalen  $\beta$ MHC-Promotorkonstrukte auszuschließen, wurden auch Konstrukte injiziert, die eine zufällige Nukleotidsequenz vor dem basalen  $\beta$ MHC-Promotor enthielten (x/h-147- $\beta$ MHC-CAT). Weder dieses Konstrukt, noch 147- $\beta$ MHC-CAT alleine

wurden in den jeweiligen Hundeherzen exprimiert (Abb. 11B)

Innerhalb der 556 Basenpaare des ANF-Promotors befindet sich auch ein *serum response element* (SRE oder CARG-Box, -423 bis -399). Wie der Abbildung 11B zu entnehmen ist, wurde das heterologe  $\beta$ MHC-Konstrukt, in das das SRE kloniert wurde, in den sham-operierten Tieren hoch exprimiert. Durch Druckhypertrophie kam es zu keiner Induktion dieses Konstruktes. Demnach scheint das SRE von Bedeutung für die basale, nicht jedoch für die induzierbare Form der Expression des ANF-Gens zu sein.

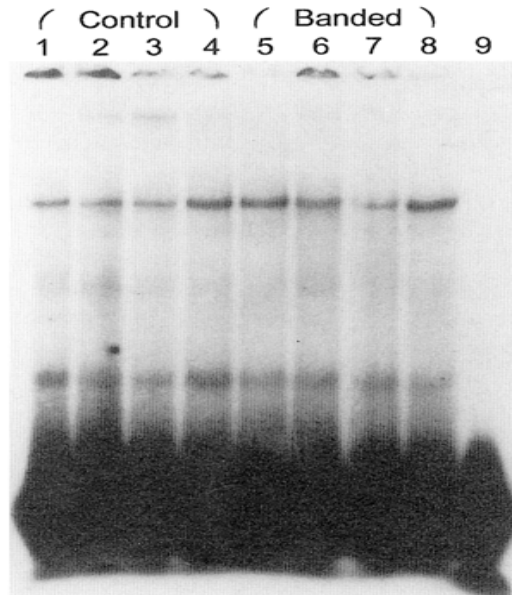


**Abbildung 11:** Effekt der Druckbelastung auf die Expression heterologer Promotorkonstrukte. **A**, Verschiedene regulatorische Elemente (AP1-Stelle: AP1-147- $\beta$ MHC; CRE-Stelle: CRE-147- $\beta$ MHC) wurden mit dem basalen  $\beta$ MHC-Promotor (-147- $\beta$ MHC) fusioniert. ANF-Wildtyp, -3400-ANF. **B**, Verschiedene regulatorische Elemente (SRE-Stelle: SRE-147- $\beta$ MHC; zufällige Nukleotidsequenz: x/h-147- $\beta$ MHC) wurden mit dem basalen  $\beta$ MHC-Promotor (-147- $\beta$ MHC) fusioniert. CAT-Werte wurden für die entsprechenden Luciferase-Werte derselben Injektionsstelle normalisiert (CAT/Luc ratio x 100). Druckbelastung (schwarze Balken), sham-operiert (schraffierte Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM (n = 7 für jedes Konstrukt). \*, signifikanter Unterschied zur Sham-Gruppe.

*Die ANF-AP1 Bindungsstelle wird von DNA-bindenden Proteinen erkannt.*

Nachdem die Bedeutung der AP1-Bindungsstelle für die Induktion des ANF-Gens bei Druckhypertrophie erkannt war, war es nun von Bedeutung, zu ermitteln, ob die Induktion des ANF-Gens auch durch die gut charakterisierten AP1-Proteine vermittelt wurde. Experimente wurden durchgeführt, um die DNA-Protein Interaktion zwischen der AP1-Konsensus Sequenz, als auch der ANF-AP1-Bindungsstelle zu optimieren (Allegretto et al., 1990; Argentin et al., 1994; Kovacic-Milivojevic and Gardner, 1992; Nakabeppu et al., 1988; Rauscher et al., 1988; Rosenzweig et al., 1991; Sprenkle et al., 1995). Kernextrakte von Herzen sham-operierter oder mit *aortic banding* behandelter Tiere wurden mit der ANF-AP1-Sequenz inkubiert. Hierbei resultierte im GMSA ein singulärer Komplex (Abb. 12). Laserdensitometrische Analyse indizierte, daß sich die DNA-Bindungsaktivität

dieses Proteinkomplexes nicht zwischen den beiden Gruppen unterschied. Demnach führten 7 Tage Druckhypertrophie zu keiner qualitativen oder quantitativen Veränderung der transaktivierenden Proteine, die an die ANF-AP1-Stelle binden.

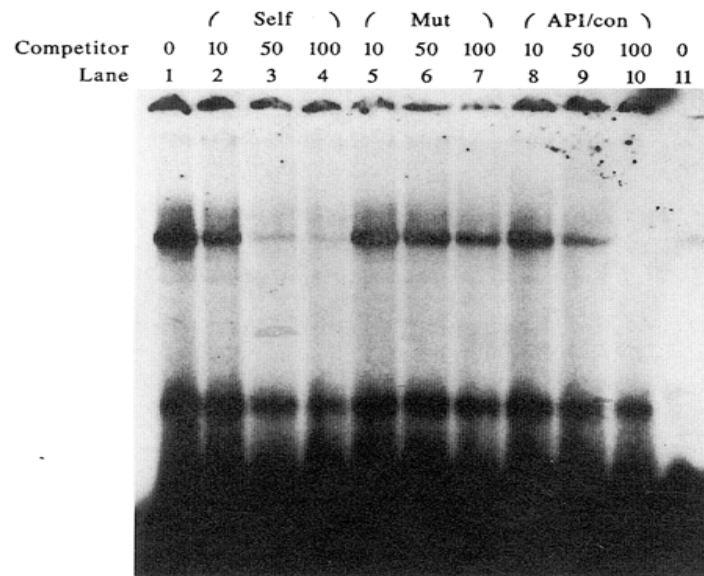


**Abbildung 12:** *Gel-Mobility-Shift-Assay* (GMSA) unter Verwendung von nukleären Extrakten aus Herzen präpariert von sham-operierten Hunden (Spur 1-4) oder von Hunden mit 7 Tagen Druckbelastung (Spur 5-8). Spur 9 zeigt die radioaktive Probe ohne Zugabe von Extrakt. 10  $\mu$ g Extrakt wurden im Bindungspuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bevor die  $^{32}$ P-ANF-AP1 doppelsträngige Probe für weitere 10 Minuten zugegeben wurde.

Um die Spezifität dieser Protein-DNA Interaktion zu ermitteln, wurden Kompetitions-GMSAs durchgeführt. Eine doppelsträngige radioaktiv markierte ANF-AP1-Probe wurde inkubiert mit (a) unmarkierter doppelsträngiger ANF-AP1-Probe (selbst; Abb. 13, Bahnen 2-4), (b) unmarkierter doppelsträngiger mutierter ANF-AP1-Probe (Abb. 13, Bahnen 5-7), oder (c) unmarkierter doppelsträngiger AP1-Konsensus Probe (Abb. 13, Bahnen 8-10). Hierbei betrug der molare Überschuss des unmarkierten Kompetitors die 10- bis 100-fache Konzentration der markierten ANF-AP1-Bindungsstelle. Wie der Abbildung 13 zu entnehmen ist, war die unmarkierte ANF-AP1-Probe in der Lage, sehr gut mit der markierten Probe um die bindenden Proteine zu kompetitieren, was für die Spezifität der Bindung dieser Proteine an die ANF-AP1-Stelle spricht. Die unmarkierte Probe mit der mutierten AP1-Stelle, die dieselbe Mutation wie das injizierte  $\Delta$ AP1-ANF-Promotorkonstrukt enthielt, konkurrierte kaum mit der markierten ANF-AP1-Probe und nur bei der höchsten Konzentration wurde die Bindung an die markierte Probe beeinträchtigt. Auch die AP1-Konsensus Probe konnte gut mit der markierten ANF-AP1-Sequenz kompetitieren. Allerdings zeigt das Gel



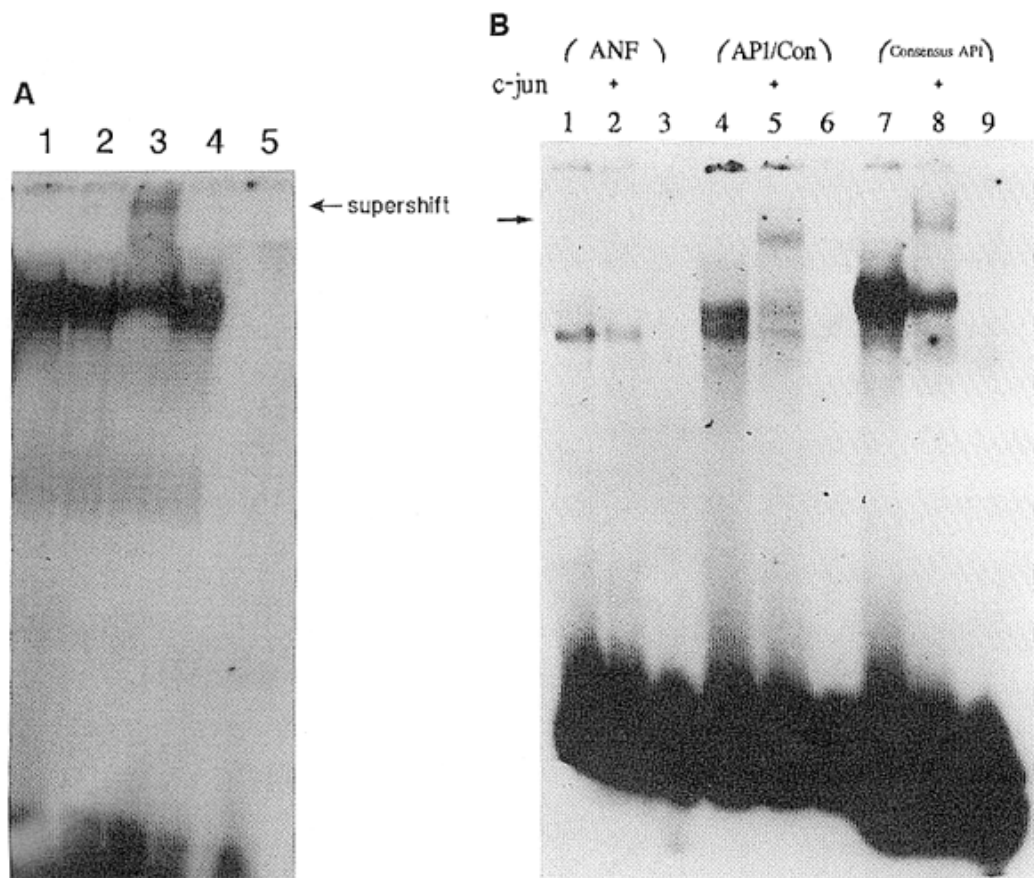
beim 50-fachen Überschuß, daß die Kompetition der ANF-AP1-Bindungsstelle effektiver war, als die der AP1-Konsensussequenz. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß die beobachtete Protein-DNA Interaktion sequenzspezifisch zu sein scheint.



**Abbildung 13:** Kompetitions-GMSA mit nukleären Extrakten aus Hundeherzen. 10 µg nukleären Extraktes wurden in Bindungspuffer für 10 Minuten inkubiert, bevor die Kompetitor-Probe direkt vor Zugabe von  $^{32}\text{P}$ -ANF-AP1 doppelsträngiger Probe zugegeben wurde. Dargestellt ist die Kompetition unter Verwendung unmarkierter Kompetitor-Probe von dergleichen Sequenz (Self; Spur 2-4), der mutierten ANF-Sequenz (Mut; Spur 5-7) und der AP1-Konversion (AP1/con, Spur 8-10) und Angabe des molaren Verhältnisses (10-100) der unmarkierten Probe. Spur 1 beinhaltet keinen Kompetitor, Spur 11 kein Extrakt.

Rosenzweig et al. haben unter der Verwendung von rekombinantem Fos und Jun (AP1 ist ein Heterodimer aus Fos und Jun) demonstriert, daß AP1-Proteine die ANF-AP1-Stelle erkennen und binden (Rosenzweig et al., 1991). Hinsichtlich der hohen Homologie zwischen der ANF-AP1-Stelle und der AP1-Konsensussequenz ist dies eigentlich nicht sehr überraschend. Um zu überprüfen, ob es sich bei den *in vivo* an die ANF-AP1-Stelle bindenden Proteine tatsächlich um Mitglieder der AP1-Familie handelt, wurden sogenannte *Supershift*-Assays durchgeführt. Hierfür fanden Antikörper Anwendung, die entweder konservierte Epitope der Proteine aus der Fos-Familie (c-fos, fosB, fra-1, fra-2), oder der Jun-Familie (c-jun, junB, junD) erkannten. Um die Spezifität der verwandten Antikörper zu ermitteln, wurde auch eine käuflich erwerbliche Probe mit den zentralen 7 Nukleotiden der AP1-Konsensussequenz verwandt. Experimente, in denen Extrakte aus Herzen mit akuter Druckhypertrophie und Präimmunserum verwandt wurden, oder in denen der Jun-

Antikörper peptidneutralisiert wurde, zeigen, daß die Antikörper-Protein-Interaktion spezifisch war (Abb. 14). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Extrakten aus COS-Zellen erzielt, die für 30 Minuten mit Phorbol ester stimuliert worden waren. Keiner der genannten Proben führte zum *Supershift* in der Anwesenheit von Präimmunserum. Obwohl die ANF-AP1-Stelle und die AP1-Konsensussequenz sich nur durch ein einziges Nukleotid unterscheiden, zeigten sie doch ein unterschiedliches Bindungsverhalten. Die ANF-AP1-Probe formte einen singulären Komplex, der durch Zugabe des Anti-Jun-Antikörpers keinen *Supershift* aufwies (Abb. 14B). Hingegen formte die AP1-Konsensus Probe einen singulären Protein-DNA-Komplex mit geringerer Mobilität als der mit der ANF-AP1-Probe. Dieser Komplex zeigte einen *Supershift* in der Anwesenheit des Anti-Jun-Antikörpers. Die ANF-zu-AP1-Konversions-Probe bildete eine Doppelbande, die mit den anderen zwei Proben übereinstimmte. Ein *Supershift* der oberen Bande konnte in Anwesenheit des Anti-Jun-Antikörpers gezeigt werden, was darauf hinweist, daß die obere Bande Jun enthält. Unter Verwendung von zellulären Extrakten aus COS-Zellen, die für 30 Minuten mit Phorbol ester behandelt worden waren, zeigte auch die ANF-Probe eine Doppelbande im GSMA (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß die AP1-Bindungsstelle des ANF-Promotors zwei Proteininteraktionen eingeht, wovon eine mit dem Heterodimer AP1 stattfindet. Dies legt nahe, daß dieses Element in der Lage ist, sowohl konstitutiv, als auch induzierbar exprimierte Proteine zu binden.



**Abbildung 14: A, Supershift-GMSA.** Die  $^{32}\text{P}$ -ANF-AP1 doppelsträngige Probe wurde mit nukleärem Extrakt aus Hundeherzen unter der Verwendung eines c-jun Antikörpers inkubiert. Spur 1 = kein Antikörper; Spur 2 = Präimmunserum; Spur 3 = c-jun Antikörper; 4 = Peptid neutralisierter c-jun Antikörper; Spur 5 = kein Extrakt. **B, Inkubation mit  $^{32}\text{P}$ -ANF/AP1 oder  $^{32}\text{P}$ -AP1/Con(version) oder Konsensus  $^{32}\text{P}$ -AP1 doppelsträngigen Proben. + in Anwesenheit des c-jun Antikörpers.** Pfeil: Position des Komplexes mit *Supershift*. Spur 3, 6 und 9 enthalten kein Extrakt. Die AP1/Con-Probe ist identisch zur ANF-Probe außer einer einzigen A- zu C-Konversion. Die AP1-Konsensus-Probe enthält das Kernseptamer der AP1-Konsensusstelle.

#### 2.2.4 Diskussion

Mit diesen Daten wird die Möglichkeit der intrakardialen *in vivo*-Geninjektion zur Untersuchung der Genexpression unter physiologischen und pathophysiologischen Zuständen demonstriert. In dieser Arbeit war das verwandte Modell eine über 7 Tage anhaltende akute Druckhypertrophie. Obwohl der angelegte Druckgradient nach 7 Tagen keinen signifikanten Anstieg des Verhältnisses von linksventrikulärem Myokard/Körpergewicht (LV/KG) bewirkte, so konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, daß dieses Modell zu einem Anstieg der LV/KG Ratio um 25% nach 6 Wochen führt (Okeefe et al., 1978). 3.4 kb der 5'-Promotorregion des ANF-Promotors reagierten mit einer 6- bis 12-fachen Induktion nach 7 Tagen Druckhypertrophie im Vergleich zu sham-operierten Tieren. Deletionsanalysen ergaben, daß hierfür ein 556 bp umspannendes Fragment des ANF-Promotors verantwortlich ist. Es wird gezeigt, daß das verantwortliche Element, das in diesem Fragment lokalisiert ist, eine AP1-Bindungsstelle darstellt. Das ANF-AP1-Element bindet einen konstitutiv exprimierten Faktor, dessen Konzentration nicht durch die Druckhypertrophie beeinflußt wird, sowie die AP1-Proteine. Das ANF-AP1-Element ist entscheidend für die Vermittlung der Induzierbarkeit des ANF-Gens bei Druckhypertrophie.

Die molekularen und biochemischen Grundlagen der Myokardhypertrophie sind Subjekt zahlreicher Studien. Mehrere verschiedene Stimuli wurden identifiziert, einschließlich mechanischer Dehnung, adrenerger Agonisten, Wachstumsfaktoren und zyklischer Nukleotide. Obwohl die myokardiale Adaptation auf mehreren Ebenen abläuft, so stellt die transkriptionelle Regulation einen integrativen Mechanismus für viele verschiedene Stimuli dar. So haben z. B. Kariya et al. gezeigt, daß die adrenerge Stimulation des  $\beta$ -MHC durch die Protein-Kinase C (PKC)- $\beta$  vermittelt wird, wahrscheinlich über eine Modulation des Phosphorylierungsstatus des TEF-1 (Kariya et al., 1993; Kariya et al., 1994). So wird auch C/EBP, ein CCAAT/*enhancer* bindendes Protein, das auch im Herzen vorkommt, über die PKC modifiziert (Rosenzweig et al., 1991). Die Möglichkeit, daß multiple *cis*-acting Elemente in Kollaboration agieren, wurde von Sprenkle et al. vorgeschlagen, indem er für die komplette  $\alpha$ -adrenerge Transaktivierung des ANF-Gens die Notwendigkeit multipler SRE demonstrierte (Sprenkle et al., 1995).

Für die Druckhypertrophie des Myokards ist die transiente Expression der sogenannten *Immediate Early Genes* charakteristisch, als auch der prolongierte Anstieg der Synthese von ANF und der

anderer Strukturproteine, die normalerweise nur im fetalen Herzen exprimiert werden (Izumo et al., 1988). Zu den *Immediate Early Genes* gehören auch c-fos und c-jun, deren regulatorisches Element, das auf Druckbelastung reagiert, ein über die PKC reguliertes SRE zu sein scheint (Argentin et al., 1994). Da fos und jun an AP1-Elemente zahlreicher Gene binden, spekulierte Rosenzweig et al., daß eine initiale Stimulation des ANF-Gens durch fos und jun eine vernünftige Hypothese darstellt (Rosenzweig et al., 1991). Dennoch bleibt bislang der Einfluß von fos und jun auf die Expression von ANF unklar. Kovacic-Milivojevic und Gardner fanden, daß die Kotransfektion von fos- oder jun-Expressionskonstrukten in neonatale Rattenkardiomyozyten dosisabhängig entweder in einer Stimulation oder in einer Hemmung der Expression eines humanen ANF-Promotorkonstruktes resultierte (Kovacic-Milivojevic and Gardner, 1992). Mit einem ähnlichen experimentellen Ansatz demonstrierten McBride et al., daß die Überexpression von c-fos und c-jun die transkriptionelle Aktivität eines transfizierten Ratten-ANF-Promotorkonstruktes reprimierte (Mcride et al., 1993). All diese Experimente wurden allerdings in dissoziierten neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt, sodaß die Ergebnisse nicht notwendigerweise auf intaktes adultes Myokard übertragbar sind.

Die Anwendung des ANF-Promotors wurde gewählt, da seine 5'-Region sowohl durch Transfektions-Assays als auch durch transgene Studien extensiv charakterisiert wurde (Argentin et al., 1994; Knowlton et al., 1991; Knowlton et al., 1995; McBride et al., 1993; Rosenzweig et al., 1991; Seidman et al., 1988; Sprenkle et al., 1995). Mehrere verschiedene funktionelle *cis*-agierende Elemente wurden demonstriert (Knowlton et al., 1991; Sprenkle et al., 1995). Hierbei scheinen die multiplen SREs entscheidend für die basale Expression des ANF-Gens zu sein. So konnte Sprenkle et al. durch eine Mutation des SRE bei -114 die Bedeutung dieser Bindungsstelle für die basale ANF-Expression demonstrieren (Sprenkle et al., 1995). Die in der vorgelegten Arbeit gezeigten Ergebnisse mit der Injektion des SRE-147- $\beta$ MHC Konstruktes sind in Übereinstimmung mit der Arbeit von Argentin et al. (Argentin et al., 1994) und legen eine bedeutende Rolle des SRE für die basale Expression des ANF-Gens nahe, da bereits eine deutliche Induktion dieses Konstruktes in der sham-operierten Gruppe zu beobachten war, die durch *aortic banding* nicht weiter gesteigert werden konnte (Abb. 11B). Obwohl im Rahmen der vorgelegten Arbeit das SRE im Kontext des übrigen ANF-Promotors nicht mutiert wurde, so schließen die mit den heterologen Promotorkonstrukten gewonnenen Ergebnisse eine Bedeutung des SRE als Mediator der Induktion des ANF-Gens nach 7 Tagen Druckbelastung weitgehend aus. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß das SRE eine transiente Rolle bei der Induktion des ANF-Gens spielt. Die genaue Bestimmung der Rolle von SREs im Kontext des ANF-Promotors würde sich problematisch gestalten, da Sprenkle et al. demonstrierte, daß z. B. für die  $\alpha$ -adrenerge Stimulation des ANF-Gens multiple SREs verantwortlich sind (Sprenkle et al., 1995).

Da mehrfach gezeigt wurde, daß CREs in die Transduktion verschiedener Wachstum stimulierender Prozesse involviert sind (Roesler et al., 1988; Sheng et al., 1988; Sheng and Greenberg, 1990), war der

Fokus dieser Arbeit die Funktion dieses regulatorischen Elementes. CRE bindet CREB. Außerdem ist es ein regulatorisches Element des ANF-Promotors, das in die  $\beta$ -adrenerge Induktion der Hypertrophie neonataler Rattenkardiomyozyten involviert ist (Knowlton et al., 1991). Gezielte Punktmutagenese des CRE des ANF-Promotors hatte weder Einfluß auf die basale, noch auf die induzierbare Expression des ANF-Gens. Dies ist in Übereinstimmung mit Befunden, die zeigen, daß der intrazelluläre Anstieg von cAMP im hypertrophierenden Myokard nicht entscheidend für die Ausbildung des hypertrophierten Phänotyps ist (Knowlton et al., 1991; Roesler et al., 1988; Sadoshima and Izumo, 1993; Xenophontos et al., 1989).

*Aortic banding* resultierte in einem 6- bis 12-fachen Anstieg der Expression des ANF-Reporterkonstruktes. Die Ergebnisse mit den heterologen ANF-AP1-Reporterkonstrukten zeigen, daß dieses Element ausreicht, um die durch Druckbelastung induzierte Induktion des ANF-Gens zu vermitteln. Direkter Vergleich der Expression der verschiedenen ANF-Promotorkonstrukte mit den heterologen Promotorkonstrukten ist nicht sinnvoll, da in letzteren das jeweilige *cis*-agierende Element aus dem Kontext des gesamten Promotors genommen ist. Mutation des ANF-AP1-Elementes zeigt, daß diese Bindungsstelle *trans*-aktivierenden Faktoren im Kontext des längsten ANF-Promotorkonstruktes (-3400-ANF-CAT) zugänglich ist. Diese Daten zeigen außerdem, daß dieses Element absolut notwendig ist, um die Druckantwort des ANF-Gens zu vermitteln. Allerdings können die hier vorgelegten Ergebnisse eine kooperative Rolle anderer regulatorischer Elemente, oder die Möglichkeit, daß andere Elemente eine temporäre Rolle für die Induzierbarkeit des ANF-Gens bei Druckbelastung spielen, nicht vollends ausschließen. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, daß die AP1-Bindungsstelle des ANF-Promotors für die Vermittlung der Induktion des ANF-Gens unter Druckbelastung verantwortlich ist.

Diese Ergebnisse unterschieden sich von denen von Knowlton et al., der den Effekt von *aortic banding* in transgenen Mäusen, die ein ANF-Reportergen trugen, und mittels Injektion von ANF-Reportergenkonstrukten in Mäuseherzen untersuchte (Knowlton et al., 1995). Hierbei konnte kein Anstieg der Expression der Reportergenkonstrukte nach 7 Tagen Druckhypertrophie beobachtet werden. Verschiedene Faktoren könnten für diese unterschiedlichen Beobachtungen verantwortlich sein. Zunächst gibt es bedeutende Spezies bezogene Unterschiede zwischen den von Knowlton verwandten Mäuse- und den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hundeherzen. Dies schließt z. B. ein unterschiedliches Muster von MHC-Isoformen ein, was unterschiedliche Adaptationsprozesse auf Druckbelastung zur Folge haben kann. So beobachteten Knowlton et al. nach 7 Tagen *aortic banding* einen Anstieg von 27% in der LV/KG Ratio im Gegensatz zu der in unserer Arbeit unveränderten LV/KG Ratio bei Hundeherzen in demselben Zeitraum. In dem hier verwandten Modell entwickelt sich eine vergleichbare Veränderung der LV/KG Ratio erst nach 6 Wochen (Okeefe et al., 1978). Dies zeigt, daß der Zeitverlauf der Adaptation an Druckbelastung unterschiedlich verläuft zwischen den verschiedenen Spezies, was durchaus auch die intrazellulären Regulationsmechanismen unterschiedlich beeinflussen kann. Außerdem gibt es einige methodische

Unterschiede zwischen den beiden Arbeiten. Die Variabilität der Expression der injizierten ANF-Reporterkonstrukte war in unserer Studie geringer als in der von Knowlton. Obwohl der genaue Grund für diesen Unterschied unklar bleibt, so könnte dies an der Schwierigkeit liegen, Plasmide in die freie Wand eines Mäuseherzens zu injizieren. Schiaffino et al. demonstrierten durch *in situ*-Hybridisierung druckbelasteter Rattenherzen, daß Marker der Hypertrophie regional und nicht synchron exprimiert werden (Schiaffino et al., 1989). Injektion in den Apex, wo die Wandspannung weniger durch Hypertrophie beeinflussbar ist, könnte deshalb weniger geeignet sein, um die Induktion von ANF-Reportergenkonstrukten zu bestimmen.

Die Konkurrenzexperimente unter Verwendung der unmarkierten ANF- und AP1-Konversions-Oligonukleotide ergaben, daß beide in der Lage waren, die markierte ANF-Probe aus der Bindung zu verdrängen. Andere Konkurrenzexperimente, bei denen eine Probe verwandt wurde, die nur das zentrale Septamer der ANF-Sequenz (ATGAATCA) enthielt, zeigten, daß nur höhere Dosen eines AP1-Konsensus-Oligonukleotids in der Lage waren, mit der Bindung zu konkurrieren. Mutierte DNA-Oligonukleotide waren nicht in der Lage, effektiv um die Bindung zu konkurrieren. Daraus wird ersichtlich, daß sogar geringe Veränderungen der zentralen Septamersequenz erheblich die DNA-Protein-Interaktion beeinträchtigen. Veränderungen einzelner Nukleotide innerhalb der AP1-Konsensussequenz führen erwiesenermaßen zu einer Beeinträchtigung der Affinität für AP1-Proteine (Busch and Sassone-Corsi, 1990; Nakabeppu et al., 1988; Rauscher et al., 1988). Busch und Sassone-Corsi fanden ebenfalls ein zur AP1-Konsensussequenz unterschiedliches Bindungsmuster unter Verwendung derselben Sequenz wie die des ANF-Promotors der Ratte (TGAATCA) unserer Arbeit (Busch and Sassone-Corsi, 1990). Nakabeppu et al. zeigten, daß unmarkierte Kompetitorsequenzen, die als zentrales Septamer die Sequenzen TGACTCT oder TGACTCG enthielten, nicht in der Lage waren, mit der AP1-Konsensussequenz um die AP1-Bindung zu konkurrieren (Nakabeppu et al., 1988). Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß die DNA-Protein-Interaktion sequenzspezifisch und für die Induktion der Expression der ANF-Promotorkonstrukte essentiell ist.

Die Ergebnisse der Experimente zur Bestimmung der DNA-Protein-Interaktion sind in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Kovacic-Milivojevic and Gardner, 1992; McBride et al., 1993; Rosenzweig et al., 1991). Kovacic-Milivojevic und Gardner demonstrierten, daß *in vitro* translatiertes fos und jun an ein humanes ANF-Kpnl/PvuII-Fragment binden (Position -337 bis -208), eine Region, die nicht mit der von uns untersuchten übereinstimmt (Kovacic-Milivojevic and Gardner, 1992). Rosenzweig et al. hingegen zeigten, daß rekombinantes fos und jun an dieselbe ANF-Region (-506 bis -483) des Ratten-ANF-Promotors binden, wie die von uns untersuchte Region. In der Anwesenheit von gereinigtem fos/jun konnten die Autoren zeigen, daß ein unmarkiertes AP1-Konsensussegment genauso effektiv um die AP1-Bindung konkurrieren konnte wie ein unmarkiertes zur ANF-AP1-Stelle identisches Oligonukleotid (Rosenzweig et al., 1991). Wenn die Autoren hingegen nukleäre Vorhofextrakte verwandten, konnte die AP1-Konsensussequenz nur noch gering mit der Bindung konkurrieren, was darauf hinweist, daß zwei unterschiedliche Proteinkomplexe gebunden werden.

Diese Befunde entsprechen den von uns erhobenen, die ebenfalls zeigen, daß die ANF-AP1-Bindungsstelle AP1-Proteine, aber auch ein noch unbekanntes konstitutiv exprimiertes Protein bindet.

Zusammenfassend legen unsere Daten nahe, daß die ANF-AP1-Bindungsstelle verantwortlich ist für die Induktion des ANF-Gens bei Druckbelastung. An dieses Element binden sowohl konstitutiv exprimierte Proteine, deren Konzentration von der Druckbelastung nicht beeinflußt wird, und zumindest temporär auch AP1-Proteine. Bis jetzt ist unklar, welche Rolle den jeweiligen Proteinkomplexen bei der Regulation der Expression des ANF-Gens zukommt. Auch ist die Identität des konstitutiv exprimierten Proteinkomplexes offen und muß durch fortführende Studien geklärt werden.

### **3. Zweiter Abschnitt: Die Bedeutung der Zellzyklusregulation für Wachstum und programmierten Zelltod kardialer Zellen evaluiert anhand der Überexpression des Transkriptionsfaktors E2F-1**

#### **3.1 Einleitung**

Kurz nach der Geburt verlieren Kardiomyozyten ihre Eigenschaft, sich zu teilen und arretieren dauerhaft im Zellzyklusarrest. Dies macht das Herz ganz besonders empfindlich gegenüber ischämischen, toxischen oder inflammatorischen Ereignissen, die mit dem Verlust kontraktile Gewebes einhergehen, denn es hat aufgrund des Zellzyklusarrestes die Fähigkeit zur Regeneration verloren. Dennoch, im Gegensatz zur Skelettmuskulatur, in der sich Zelldifferenzierung und Zellteilung komplett ausschließen, sind Herzmuskelzellen prinzipiell zur simultanen Ausdifferenzierung und Zellteilung in der Lage, wie dies in der gesamten fötalen myokardialen Ontogenese zu beobachten ist (Goldstein et al., 1974). Deswegen stellt die Vorstellung der Reinduktion der Zellteilung in ausdifferenzierten Herzmuskelzellen einen interessanten Ansatz für zukünftige Formen der Behandlung der Herzinsuffizienz dar. Tatsächlich haben mittlerweile mehrere Untersuchungen gezeigt, daß die Überexpression verschiedener Zellzyklusfaktoren zur Induktion der S-Phase des Zellzyklus in Kardiomyozyten führen kann (Agah et al., 1997; Field, 1988; Kirshenbaum et al., 1996; Kirshenbaum and Schneider, 1995; Liu and Kitsis, 1996; Sen et al., 1988; Soonpaa et al., 1997).

Der Zellzyklus wird durch eine komplexe Interaktion und ein stöchiometrisches Equilibrium von Inhibitoren und Aktivatoren des Zellzyklus reguliert. Besonders gehören die *cdks* (*cell cycle dependent kinases*) zu den kritischen Regulatoren der Zellteilung in eukaryoten Zellen. Die sequentielle Aktivierung individueller Mitglieder dieser Kinase-Familie und die anschließende Phosphorylierung spezifischer Substrate steuern die Progression durch den Zellzyklus (Pines, 1995). Cdk's formen dabei quaternäre Komplexe, die aus den *cdks*, Zyklinen, PCNA (*proliferating cellular nuclear antigen*) und einem Vertreter der Familie der *ckd*-Inhibitoren bestehen. Hierbei wird die enzymatische Aktivität der *cdks* auf drei verschiedenen Ebenen reguliert: Aktivierung der Zykline, Phosphorylierung der

Untereinheit, Assoziation mit cdk-Inhibitoren (Morgan, 1995). Die Formierung der Komplexe aus cdk4 oder cdk6 mit D-Typ Zyklinen und cdk2 mit Zyklin A oder Zyklin E ist entscheidend für den Eintritt in die S-Phase. Diese Zyklin/ckd-Komplexe werden durch zwei Inhibitor-Familien reguliert, der INK4-Familie und der CIP/KIP-Familie (Harper, 1997). INK4-Proteine und Proteine der CIP/KIP-Familie unterscheiden sich strukturell und interagieren mit Zyklinen und ckds auf sehr unterschiedliche Weise. So binden die INK4-Proteine spezifisch an cdk4 und cdk6. Im Gegensatz hierzu binden CIP/KIP-Proteine wie p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> oder p57<sup>KIP2</sup> an eine Vielzahl von Zyklin/ckd-Komplexen einschließlich Zyklin D/ckd4 oder Zyklin D/ckd6, Zyklin E/ckd2 während der G1-Phase und Zyklin A/ckd2 während des G1/S-Übergangs und während der gesamten S-Phase (Pines, 1995).

Nur sehr wenig ist bekannt über die Regulation der Zellzyklusmaschinerie während der unterschiedlichen Entwicklungsphasen der Kardiomyozyten. Der postnatale Zellzyklusarrest korreliert mit dem Aktivitätsverlust und dem koordinierten Verschwinden der meisten Zykline und ckds (Brooks et al., 1997; Flink et al., 1998; Kang and Koh, 1997; Liu et al., 1998; Yoshizumi et al., 1995), sowie dem Anstieg einiger cdk-Inhibitoren im Myokard (Flink et al., 1998; Koh et al., 1998). Das offensichtliche therapeutische Potential eines regenerativen myokardialen Wachstums zur Reparatur kardialer Läsionen hat eine intensive Suche nach Strategien ausgelöst, die die Aufhebung des Zellzyklusarrestes von Kardiomyozyten zum Ziel haben. In der Tat konnte kürzlich eine Studie zeigen, daß viral-vermittelte Überexpression von E2F-1 den Zellzyklusarrest in Kardiomyozyten aufheben kann (Kirshenbaum et al., 1996). Wie bereits bei der Überexpression von E1A kam es aber auch hierbei zur massiven Induktion von Apoptose, die ebenfalls durch simultane Überexpression von E1B verhindert werden konnte. E2F-1-induzierte Apoptose wurde auch *in vivo* beobachtet und wurde p53-unabhängig induziert (Agah et al., 1997).

Um die molekularen Mechanismen zu analysieren, die dem Zellzyklusarrest und der Induktion von Apoptose zugrunde liegen und die letzteres verhindern, wurde E2F-1 in Anwesenheit von IGF-I (*insulin-like growth factor I*) überexprimiert.

### **3.2 Methoden**

#### *Primärkulturen neonataler Rattenkardiomyozyten*

Es wurden ventrikuläre Kardiomyozyten von 1 bis 3 Tage alten Wistar Ratten isoliert und kultiviert wie andernorts beschrieben (Simpson et al., 1982), jedoch mit leichten Modifikationen. Hierbei wurden die Herzen der neonatalen Ratten entfernt und zerkleinert und in PBS aufgenommen. Das Gewebe wurde trypsiniert bei 37° Celsius in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung: 20 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.6, 130 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 1 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mmol/L Glucose, 0.15% Trysin (Biochrom) und 30 Einheiten/mL DNase I. Nach kurzer Zentrifugierung wurden die Zellen resuspendiert in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)/F-12, das mit 2.5% hitze-inaktiviertem



Pferdeserum, 0.2% BSA, 2 mmol/L L-Glutamin, 3 mmol/L Na-Pyruvat, 100 µmol/L Vitamin C, 1 µg/mL Insulin, 1 µg/mL Transferrin, 1 µg/mL Selenium, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin ergänzt wurde (im weiteren als Kulturmedium bezeichnet). Die dissoziierten Zellen wurden für 1 Stunde bei 37° Celsius in der Anwesenheit von 0.1 mmol/L BrdU präplatiert, um die Kulturen für nicht proliferierende Kardiomyozyten anzureichern. Die resultierende Zellsuspension ( $4 \times 10^6$  Zellen) wurde auf 60 mm Kulturschalen, die mit Kollagen I überzogen sind, in Kulturmedium gegeben. Mehr als 90% der Zellen wurden durch Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen sarkomeres Tropomyosin (CH1, Sigma) als Kardiomyozyten identifiziert. Die Zellkulturen wurden bei 37° Celsius und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

### *Rekombinante Adenovirus-Konstrukte und Infektionen*

Die adenoviralen Konstrukte Ad-Luc (enthält die cDNA der Luciferase-Gens) und Ad-β-Gal (enthält die cDNA des LacZ-Gens) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Michael Strauss, MDC, Berlin, zur Verfügung gestellt. Das rekombinante Ad-E2F-1 Konstrukt wurde unter Verwendung eines adenoviralen Vektors mit einem CMV-Promotor (Gomez Foix et al., 1992) (freundliche Gabe von Dr. Robert Gerard, Leuven, Belgien) und der humanen E2F-1 cDNA (freundliche Gabe von Dr. Martin Lipp, MDC, Berlin) hergestellt. HEK 293 Zellen (ATCC) wurden für die homologe Rekombination und Verpackung verwandt. Die adenoviralen Rekombinanten wurden mittels mehrfachem Gefrieren/Auftauen aus den HEK-Zellen freigesetzt und mittels Cäsium-Chlorid Zentrifugation isoliert. Der Titer des Virus wurde mittels direkter Immunfluoreszenz-Färbung des adenoviralen Hexon-Proteins (DAKO) bestimmt. Die Zellkulturen neonataler Kardiomyozyten wurden mit Ad-E2F-1 oder Ad-Luc mit 20 pfu (*plaque forming units*) pro Zelle für 1.5 Stunden infiziert. Die infizierten Zellen wurden in der Ab- oder Anwesenheit von IGF-I (50 ng/mL, lot 1484300, Boehringer Mannheim) für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Effizienz der Infektion neonataler Kardiomyozyten betrug über 90% (bestimmt mit Ad-β-Gal mit 10 bis 50 pfu/Zelle und β-Gal-Assay).

### *Immunfluoreszenz, in situ Apoptose-Assay und in situ DNA-Synthese-Assay*

Alle Prozeduren wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die Lösungen wurden angesetzt in PBS mit 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> und 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7.2. Kardiomyozyten, die auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen kultiviert worden waren, wurden mit PBS gespült und in 3.7% Formaldehyd für 10 Minuten fixiert. Zur Bestimmung von exogenem E2F-1 wurden die Zellen für 15 Minuten mit Triton X-100 permeabilisiert, mit 5% Ziegsenrum und 0.2% Tween 20 geblockt für 15 Minuten und für 1 Stunde mit 10 µg/mL eines polyklonalen anti-E2F-1 Antikörpers (Santa Cruz) inkubiert. Zur Identifizierung von Kardiomyozyten wurden sowohl TUNEL-, als auch E2F-1 gefärbte immobilisierte Zellen für 1 Stunde mit einem anti-sarkomeren Tropomyosin Antikörper inkubiert. Die Proben wurden anschließend gespült und für 30 Minuten mit TRITC-konjugiertem Ziege gegen Maus Sekundär-Antikörper (Dianova, Verdünnung 1:50) und einem FITC-konjugiertem Ziege gegen Kanninchen Sekundär-Antikörper (Dianova, Verdünnung 1:50) inkubiert.

Der durch die terminale Deoxyribonukleotidyl-Transferase vermittelte TUNEL-Assay wurde durchgeführt, um DNA-Fragmentierung *in situ* festzustellen. Die methodische Prozedur wurde nach Vorgabe durch den Hersteller (Oncor) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen für 5 Minuten mit dem Equilibrierungs-Puffer vorinkubiert und anschließend mit der Deoxyribonukleotidyl-Transferase in Anwesenheit von Digoxigenin-gekoppeltem dUTP für 1 Stunde bei 37° Celsius inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe und Inkubation des Stopp-Puffers für 30 Minuten. Danach wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen für 8 Minuten mit Propidium Jodid (5 µg/mL in PBS, pH 7.4) und 50 µg/mL RNase A (ohne DNase) gefärbt und anschließend mit PBS gewaschen und auf Objektträger aufgetragen.

Für den Nachweis der DNA-Synthese wurde BrdU-Markierung von Zellen auf Deckgläschen angewandt. 24 Stunden nach Infektion mit Ad-E2F-1 oder Ad-Luc (20 pfu/Zelle) wurden die Zellen mit 30 µmol/L BrdU (Sigma) in der Anwesenheit von IGF-I (50 ng/mL) für 4 Stunden markiert, sodann in 3.7% Formalin fixiert und mit PBS/0.1% Triton X-100 permeabilisiert. Für den Nachweis von inkorporiertem BrdU wurden die Zellen mit 2 N HCl/Triton X-100 für 2 Minuten inkubiert und in 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 8.5, für 10 Minuten neutralisiert. Die Zellen wurden mit FITC-konjugiertem anti-BrdU Antikörper (B44, Becton Dickinson) nach den Instruktionen des Herstellers gefärbt.

#### *[<sup>3</sup>H]-Methyl-Thymidin-Einbau*

24 Stunden nach Infektion wurden 2.5 µCi/mL [<sup>3</sup>H]-Methyl-Thymidin (247.9 GBq/mmol, NEN) zu den Kardiomyozytenkulturen für 6 Stunden zugegeben. Die Zellen wurden dann mit 15% Trichloressigsäure extrahiert. Das Präzipitat wurde dann in 0.5 mL NaOH aufgenommen und mit 0.5 mL HCl neutralisiert. Die Radioaktivität wurde dann in einem Szintillationszähler gemessen.

#### *Durchflußzytometrie zur Analyse von Zellzyklus und Apoptose*

24 Stunden nach der Infektion wurden trypsinierte Zellen zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht in 70% Äthanol fixiert. Danach wurden die Zellen kurz zentrifugiert und in PBS rehydriert. Nun wurden die Zellen mit 20 µg/mL Propidium Jodid auf ihren DNA-Gehalt gefärbt und die Zellen in einem Durchflußzytometer (Coulter Epics) analysiert, wobei die Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellzyklusstadien mittels Multicycle-Software (Coulter) erfolgte. Zur Bestimmung apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Fluos-Färbung (Boehringer Mannheim) wurden die Zellen nach den Instruktionen des Herstellers präpariert.

#### *Präparation von Ganzzellextrakten*

Trypsinierte Zellen wurden in eiskaltem PBS zweimal gewaschen und auf Eis lysiert in einem Puffer mit 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.5% (V/V) Triton X-100, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 50 U/mL DNase I, 50 U/mL RNase A, den Protease-Inhibitoren PMSF (1 mmol/L),

Aprotinin (0.3 mmol/L), Leupeptin (1  $\mu$ mol/L), Pepstatin (1  $\mu$ mol/L, sowie Phosphatase-Inhibitoren NaF (25 mmol/L),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (0.1 mmol/L) und Sojabohne (100  $\mu$ g/mL) als Trypsin-Inhibitor. Zusätzlich wurden die Zellen durch eine 26-Gauge Nadel aspiriert, um eine nahezu vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Die Zellextrakte wurden für 30 Minuten bei 4° Celsius mit 18.000 x g zentrifugiert. Die Proben wurden dann bei -80° Celsius bis zur weiteren Analyse gelagert.

#### *Immunpräzipitation und Immunoblotting*

Folgende Antikörper fanden Verwendung: anti-pRb, anti-E2F-1, anti-DP1, anti-PCNA, anti-p16<sup>INK4</sup>, anti-p21<sup>CIP1</sup>, anti-p27<sup>KIP1</sup>, anti-p57<sup>KIP2</sup>, anti-Zyklin A, anti-Zyklin D1, anti-Zyklin E, anti-cdc2, anti-cdk2, anti-cdk4, anti-cdk6 (alle von Santa Cruz), anti-sarkomeres Tropomyosin (Sigma).

Zellextrakte (500  $\mu$ g Gesamtprotein; 1.0 mg Gesamtprotein für Zyklin E) wurden mit Protein G-Agarose Kügelchen vorgereinigt (Boehringer Mannheim) und mit den entsprechenden Antikörpern (1-2  $\mu$ g/mL) inkubiert. Koimmunpräzipitationsstudien wurden mit 2.0 mg Protein in 1.0 mL Lyse-Puffer durchgeführt. Dann wurden die Immunkomplexe mit 20  $\mu$ l Protein G-Agarose für 2 Stunden präzipitiert, in Lyse-Puffer dreimal für 10 Minuten gewaschen, woraufhin 30  $\mu$ l SDS Puffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 1% w/v 1,4-DTT, 2% w/v SDS, 0.01% w/v Bromphenolblau) zugegeben wurde. Die Zellextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen übertragen, geblockt und mit den Primär-Antikörpern (0.5-5.0  $\mu$ g/mL) inkubiert. Anschließend wurden sie mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Normalisierung gleicher aufgetragener Menge wurde ein kleines Aliquot (50  $\mu$ g Gesamtprotein) auf SDS-PAGE aufgetragen und mit anti-sarkomerem Tropomyosin Antikörper inkubiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit verstärkter Chemilumineszenz (Amersham).

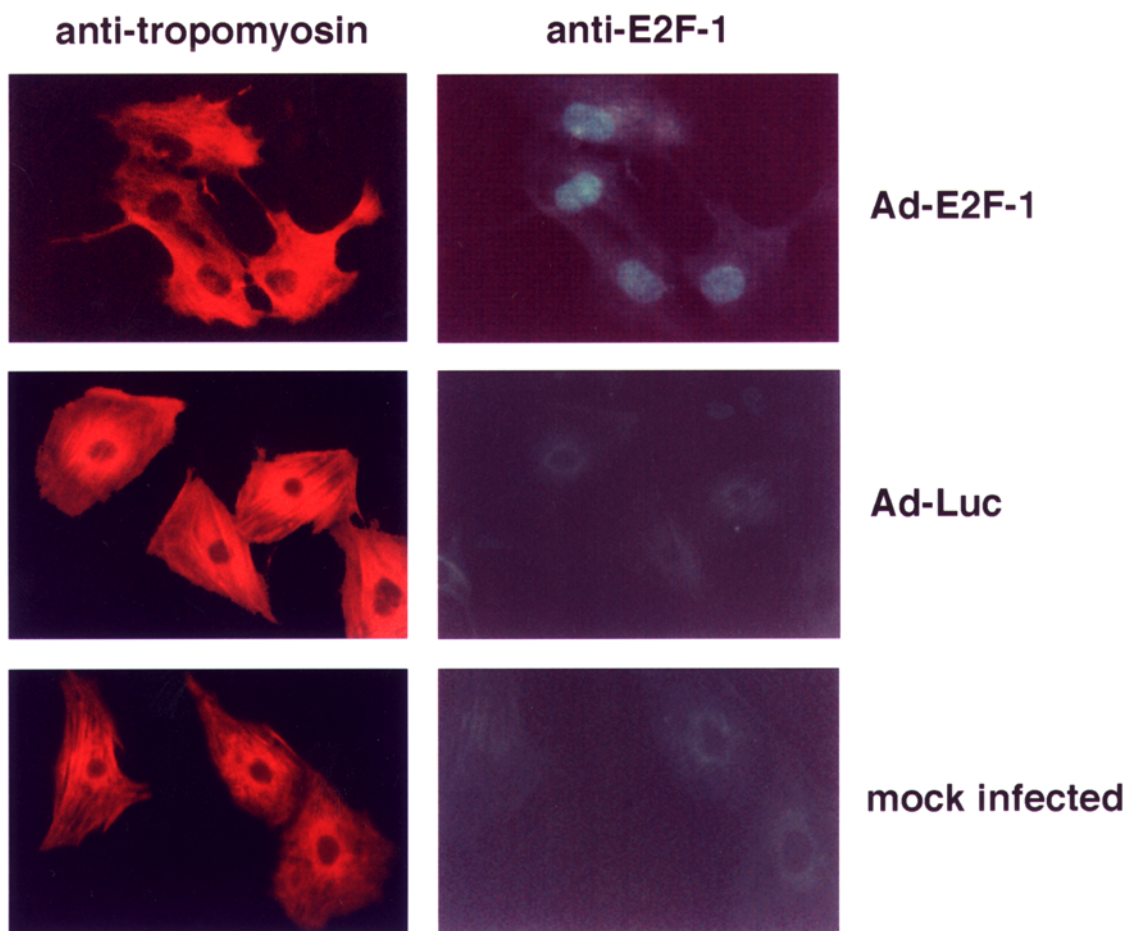
#### *Assays zur Bestimmung der Protein-Kinase Aktivität*

Immunkomplexe wurden dreimal mit eiskaltem Kinase Puffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,5, 10 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 1 mmol/L 1,4-DTT) gewaschen und in einer Mischung resuspendiert, die 5  $\mu$ g lysinreiches Histon-H1 (Typ IIIS, Sigma), 1  $\mu$ mol ATP, 3  $\mu$ mol  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu$ mol cAMP-Hemmer (Santa Cruz), 20  $\mu$ Ci ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP (111 MBq/mmol, NEN) und Kinase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l enthielt. Zur Bestimmung der Aktivität von cdk4 und cdk6 wurden 5.0  $\mu$ g rekombinantes Rb-Protein (Aminosäuren 769-921, Santa Cruz) verwandt. Nach 30-minütigem Schütteln bei 30° Celsius wurde die Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu$ l 2 x SDS-Puffer gestoppt. Die Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die Menge inkorporierter radioaktiver Markierung wurde mittels Phosphorimager (Fuji) und dem TINA Software Programm (Raytest) ermittelt.

### 3.3 Ergebnisse

#### *IGF-I verhindert E2F-1-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten*

Um den protektiven Effekt von IGF-I gegen E2F-1-induzierte Apoptose zu überprüfen, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit Ad-E2F-1 oder Ad-Luc (20 pfu/Zelle) in der An- oder Abwesenheit von IGF-I (50ng/mL) infiziert. Die Expression und nukleäre Lokalisation exogenen E2F's in Kardiomyozyten wurde durch Doppelimmunfärbung mit einem anti-E2F-1- und einem anti-sarkomeres Tropomyosin-Antikörper bestätigt. Abbildung 15 illustriert die im Vergleich mit Ad-Luc infizierten oder uninfizierten Kulturen hohen Expressionswerte nukleären E2F-1's 24 Stunden nach Infektion der Kulturen. Außerdem erkennt man, daß die endogenen E2F-1 Expressionsspiegel unter den gegebenen Umständen nicht meßbar waren.

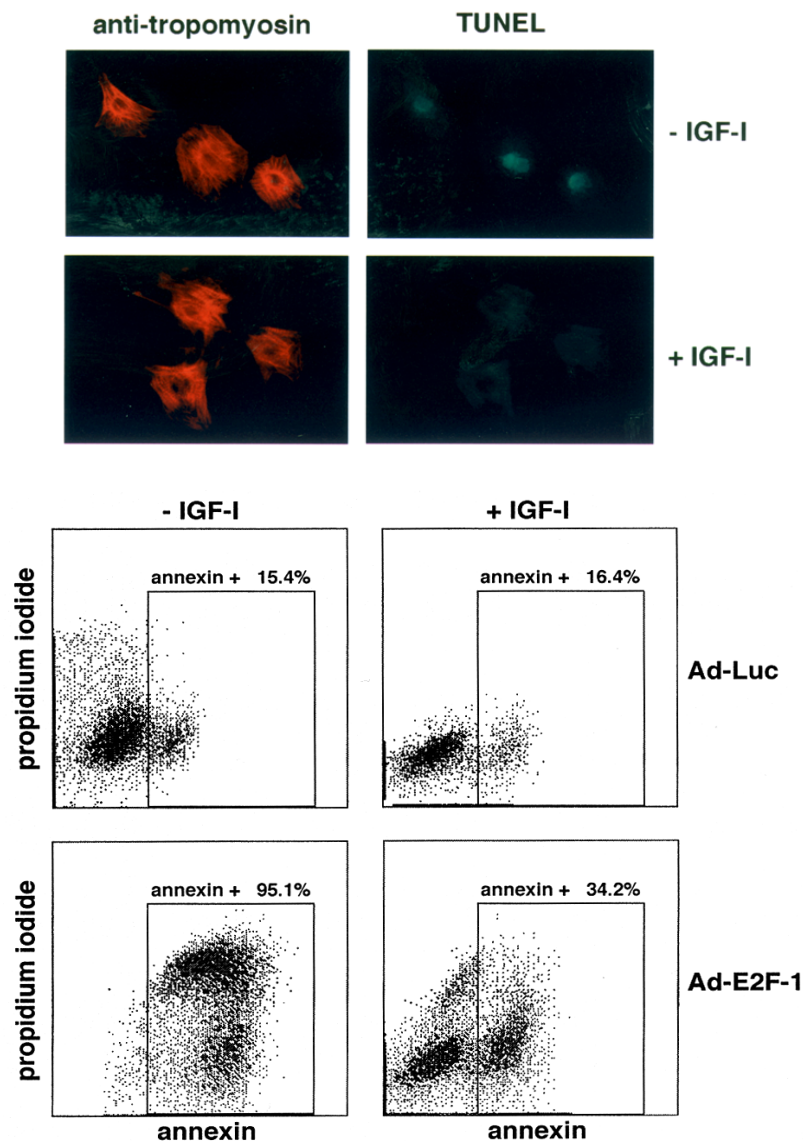


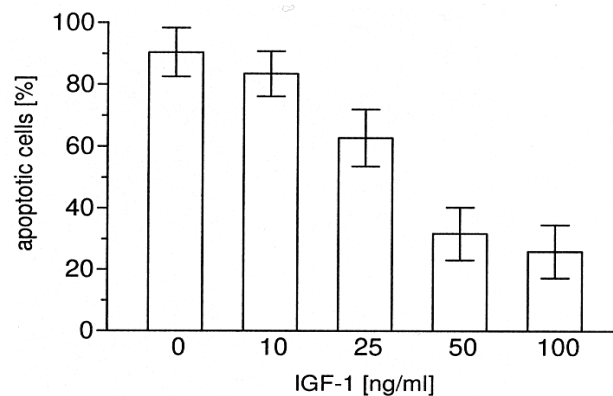
**Abbildung 15:** Expression und nukleäre Lokalisation von adenoviral übertragenem E2F-1 in Kardiomyozyten neonataler Ratten, die mit 20 pfu/Zelle Ad-E2F-1 oder Ad-Luc oder zum Schein infiziert wurden. Nach Kultivierung für 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit indirekter Immunfluoreszenz mit polyklonalem Kaninchen anti-E2F-1 Antikörper (grün) und kardial spezifischem monoklonalem Maus anti-sarkomeres Tropomyosin Antikörper (rot) doppelt gefärbt.

In der Abwesenheit von IGF-I waren fast alle Zellen, die E2F-1 überexprimierten, aufgrund von Apoptose zugrunde gegangen, was mittels TUNEL-Assay detektiert wurde (Abbildung 16A). IGF-I

war in der Lage, E2F-1 überexprimierende Zellen vor der Apoptose zu retten (Abbildung 16A).

Um die Anzahl apoptotischer Zellen quantitativ zu erfassen, wurde ein Annexin-V-Assay in Verbindung mit Durchflußzytometrie angewandt. Die Translokation von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Seite der Plasmamembran ist ein frühzeitiges Ereignis der Apoptose. Annexin-V bindet Phosphatidylserin mit hoher Affinität und stellt somit einen sehr sensitiven Nachweis apoptotischer Zellen dar. Kardiomyozytenkulturen, die mit Ad-E2F-1 in der Abwesenheit von IGF-I infiziert worden waren, wiesen einen sehr hohen Anteil Annexin-V positiver Zellen auf (95.1%; Abbildung 16B). Im Gegensatz hierzu führte die Zugabe von IGF-I zum Kulturmedium dosisabhängig zu einer Reduktion der apoptotischen Zellen (Abbildung 16C).

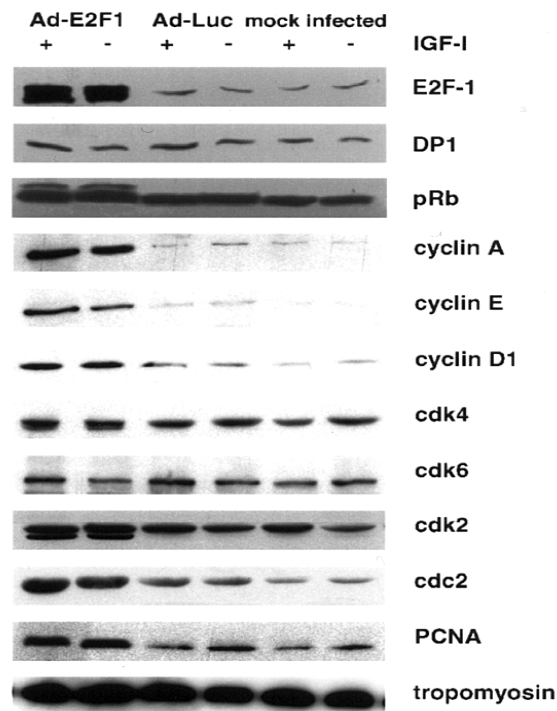




**Abbildung 16:** E2F-1 vermittelte Apoptose wird durch IGF-I in Kardiomyozyten neonataler Ratten inhibiert. Die Kulturen wurden mit Ad-E2F-1 infiziert und für 24 Stunden in der An-, bzw. Abwesenheit von IGF-I kultiviert. **A**, Darstellung apoptotischen Zelltods durch TUNEL mit einem FITC-konjugiertem anti-Digoxigenin Antikörper (grün). Kardiomyozyten wurden durch Doppelfärbung mit einem anti-sarkomeren Tropomyosin Antikörper (rot) identifiziert. **B**, trypsinisierte, unfixierte Zellen wurden mit Annexin V FLUOS und Propidiumiodid gefärbt und der Prozentsatz Annexin-positiver Zellen im FACS quantifiziert. Das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes ist dargestellt. **C**, Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Annexin V FLUOS Experimenten sind dargestellt zur Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve des Effektes von IGF-I auf E2F-1-induzierte Apoptose.

*Überexpression von E2F-1 führt zur Induktion der Expression von Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen und der Phosphorylierung von pRb*

Zur Analyse des Effektes von IGF-I und E2F-1 auf die Phosphorylierung von pRb wurden Lysate von Kardiomyozyten einer Immunpräzipitation unterworfen. In Zellen, die mit Ad-Luc infiziert worden waren, wurde pRb als eine singuläre Bande detektiert, die die hypophosphorylierte und Wachstum inhibierende Form darstellt (Abb. 17). Im Gegensatz hierzu führte die Überexpression von E2F-1 zur Darstellung einer zweiten, weniger mobilen Bande, die das inaktive hyperphosphorylierte pRb repräsentiert (Abb. 17). Interessanterweise war das Auftreten dieser Bande unabhängig von der Anwesenheit von IGF-I im Kulturmedium. Weiterhin wurde die Überexpression von E2F-1 begleitet von der Induktion verschiedener Zellzyklusregulatoren wie cdc2, den Zyklinen D1, E und A, sowie dem Replikations-assoziierten Faktor PCNA (Abb. 17). Auch auf die Induktion dieser Faktoren hatte die Anwesenheit von IGF-I keinen Einfluß. Es wurde bereits andernorts gezeigt, daß die Koexpression von DP1 zusammen mit E2F-1 in ruhenden REF52 Zellen keinen Einfluß auf die E2F-1-vermittelte Aktivierung von E2F-1-Zielgenen hat (DeGregori et al., 1997). Dies zeigt, daß die endogenen Mengen an DP1 ausreichen, um die transkriptionelle Aktivität von E2F-1 zu vermitteln (Abb. 17).



**Abbildung 17:** E2F-1 induziert die Expression bedeutender Zellzyklus-Faktoren in Kardiomyozyten. Kardiomyozyten neonataler Ratten wurden behandelt wie in Abb. 16 beschrieben. Aliquote von Ganzzellextrakten (500  $\mu$ g Gesamtprotein) wurden mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine immunpräzipitiert, aufgetrennt mittels denaturierendem PAGE und mit denselben Antikörpern immun-geblottet. Zur Normalisierung wurde ein kleineres Aliquot (50  $\mu$ g Gesamtprotein) direkt einer SDS-PAGE unterzogen und mit einem anti-sarkomeren Tropomyosin Antikörper inkubiert. Repräsentative Blots von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

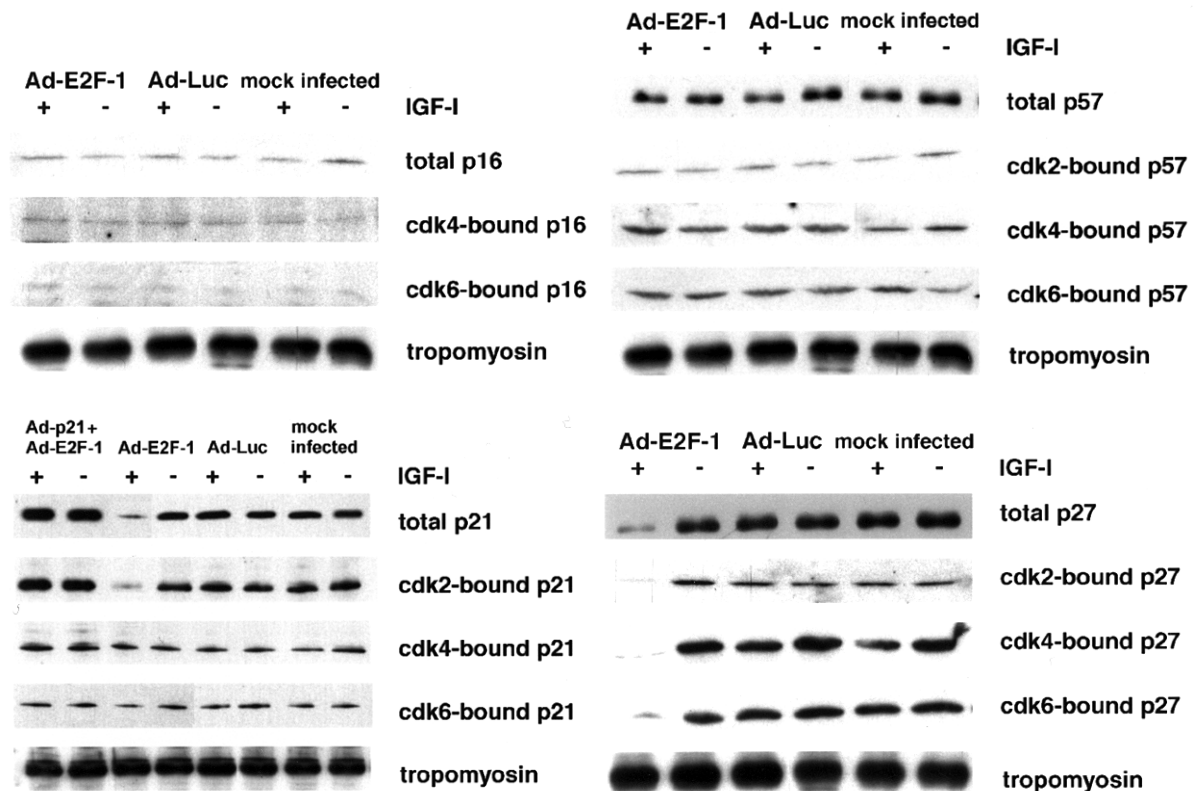
*In der Anwesenheit von IGF-I induziert E2F-1 die Herabregulation von p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup>*

Die cdk-Inhibitoren p16<sup>INK4</sup>, p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> und p57<sup>KIP2</sup> werden in neonatalen Kardiomyozyten exprimiert (Abb. 18). Um zu klären, wie E2F-1 in Verbindung mit IGF-I auf diese ckd-Inhibitoren wirkt, wurde die Assoziation von p16<sup>INK4</sup>, p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> und p57<sup>KIP2</sup> mit cdk's in Koimmunopräzipitations-Assays untersucht. In unseren Untersuchungen wurde die Menge der cdk-Inhibitoren, die an Kinase-Komplexe gebunden waren, mittels Immunoblotting von anti-cdk-Präzipitaten mit anti-cdk-Inhibitor-Antikörpern bestimmt. Immunoblot-Analyse von Gesamtzell-Lysaten mit anti-p16<sup>INK4</sup>- und anti-p57<sup>KIP2</sup>-Antikörpern ergaben keine Veränderung der Spiegel dieser cdk-Inhibitoren während der unterschiedlichen Kulturbedingungen (Abb. 18 A-B). Im Verhältnis zu den anderen cdk-Inhibitoren waren die Spiegel für p16<sup>INK4</sup> sehr niedrig. Die Zugabe

von IGF-I zu den mit Ad-E2F-1 infizierten Zellkulturen führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Menge von p16<sup>INK4</sup>, welches an cdk4 oder cdk6 gebunden war, oder der Menge von p57<sup>KIP2</sup>, welches an cdk2, cdk4 oder cdk6 gebunden war (Abb. 18 A-B).

Immunpräzipitate von anti-cdk4 und anti-cdk6, die mit anti-p21<sup>CIP1</sup>-Antikörper inkubiert wurden, zeigten ebenfalls einen vergleichbar niedrigen Spiegel von gebundenem p21<sup>CIP1</sup>, was darauf hinweist, daß p21<sup>CIP1</sup> in Kardiomyozyten hauptsächlich an cdk2 gebunden ist (Abb. 18C). Diese Präferenz von p21<sup>CIP1</sup> für cdk2 wurde erhärtet durch die Inkubation von anti-Zyklin D1-, anti-Zyklin E- und anti-Zyklin A-Immunpräzipitaten mit anti-p21 Antikörpern (Daten nicht präsentiert). Der gesamte Proteinspiegel von p21<sup>CIP1</sup> fiel deutlich nach Behandlung Ad-E2F-1 infizierter Kardiomyozyten mit IGF-I (Abb. 18C). Außerdem war mit cdk2 assoziiertes p21<sup>CIP1</sup> unter diesen Bedingungen praktisch nicht detektierbar.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation zeigen eine höhere Sättigung von cdk4 und cdk6 mit p27<sup>KIP1</sup> als von cdk2 (Abbildung 18D). Es ist andernorts berichtet worden, daß in vitro p27<sup>KIP1</sup> eine höhere Affinität für cdk4 als für cdk2 aufweist (Toyoshima and Hunter, 1994). Unsere Ergebnisse zeigen, daß es nach Infektion mit Ad-E2F-1 in der Anwesenheit von IGF-I zu einer abrupten Abnahme der gesamten Proteinmenge von p27<sup>KIP1</sup> kam. Dementsprechend kam es zu einer deutlichen Reduktion der p27<sup>KIP1</sup>-Menge, die an cdk2, cdk4 oder cdk6 gebunden war (Abb. 18D).

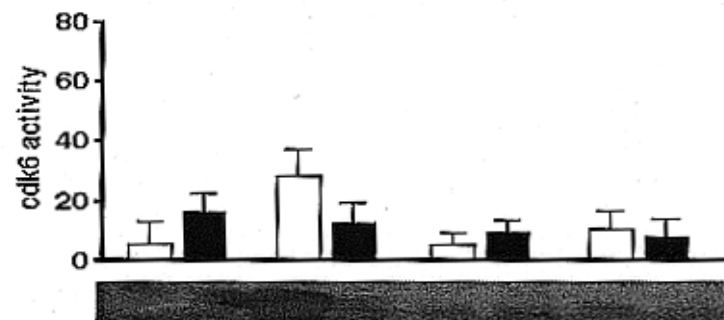
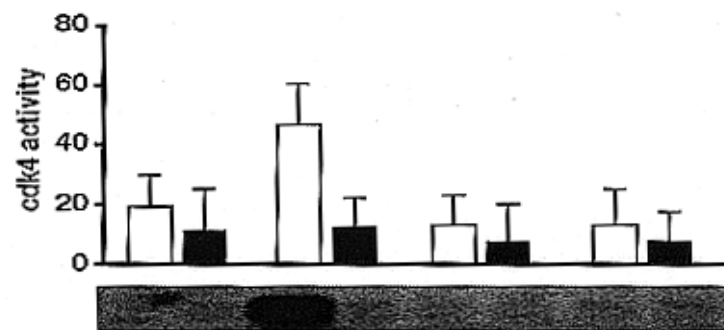
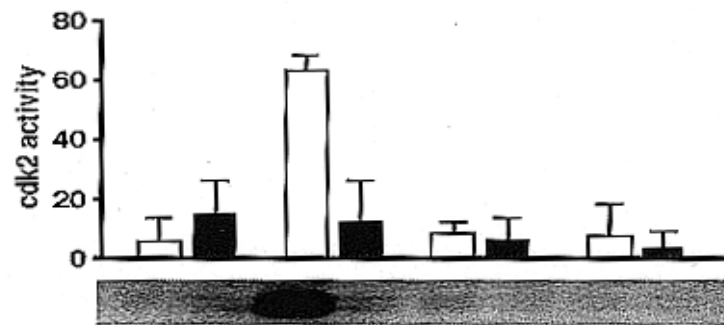




**Abbildung 18:** E2F-1 und IGF-I führen zur spezifischen Herunterregulation von p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup>. Der Effekt von E2F-1 und IGF-I auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren p16<sup>INK4</sup>, p57<sup>KIP2</sup>, p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> und ihre Interaktion mit cdk2-, cdk4- und cdk6-Kinasekomplexen wurde bestimmt. Isolierte Kardiomyozyten wurden behandelt wie in Abb. 16 beschrieben. Gesamtprotein-Levels der cdk-Inhibitoren wurden bestimmt durch Auftragen von Ganzzellextrakten (50 µg Gesamtprotein) auf SDS-PAGE und Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern. Zur Analyse der Protein-Level der inhibitorischen Faktoren in Assoziation mit den cdk's wurden Zellextrakte von den verschiedenen Bedingungen (2 mg Gesamtprotein) mit Antikörpern gegen cdk2, cdk4 oder cdk6 immunopräzipitiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf PVDF-Membranen wurden die Blots mit den entsprechenden cdk-Inhibitor spezifischen Antikörpern inkubiert. Bestimmung der gleichen Beladung von Banden wurden durchgeführt wie in Abbildung 17. Repräsentative Blots von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

*Die Herabregulation von p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> durch Überexpression von E2F-1 in der Anwesenheit von IGF-I führt zur Freisetzung aktiver Zyklin/cdk-Komplexe*

Die Phosphotransferaseaktivität der cdk's wurde mittels Immunkomplex-in vitro-Kinase-Assay ermittelt, da die Progression durch G1 und Eintritt in die S-Phase engmaschig durch die enzymatische Aktivität von cdk2, cdk4 und cdk6 reguliert wird. Die Infektion der Kardiomyozyten mit Ad-E2F-1 führte zu keinem Anstieg der Aktivität von cdk4 oder cdk6 (Abb. 19). Der Mangel an signifikanter cdk-Aktivität in Kardiomyozyten, die E2F-1 in der Abwesenheit von IGF-I überexprimieren, war - wie der Abbildung 16 zu entnehmen ist - nicht auf eine limitierte Expression von Zyklinen zurück zuführen. E2F-1-Überexpression führte in der Anwesenheit von IGF-I zur Induktion der Aktivität von cdk4 und cdk6 um das 6.2- und 5.5-Fache im Vergleich zu Kulturen ohne IGF-I (Abb. 19). Das Verschwinden von p27<sup>KIP1</sup> aus den cdk4- und cdk6-Komplexen korrelierte mit der Induktion der entsprechenden Kinaseaktivität. Die cdk2-assoziierte Histon-H1-Kinaseaktivität war in Ad-E2F-1 infizierten Kardiomyozyten in der Anwesenheit von IGF-I 4.7-fach höher als in infizierten Kulturen in der Abwesenheit von IGF-I (Abb. 19). Diese Zunahme der Aktivität von cdk2 ist am ehesten auf die Herabregulation von p21<sup>CIP1</sup> zurückzuführen, da die Expression dieser Kinase unabhängig von der Anwesenheit von IGF-I war (siehe Abb. 18). Das absolute Ausmaß der cdk2-Aktivität war signifikant höher als das der Aktivität von cdk4 und cdk6. In der Anwesenheit von IGF-I führte die Überexpression von E2F-1 zu einem Anstieg der Zyklin E-, Zyklin A- und cdc2-assoziierten Kinaseaktivität (Daten nicht präsentiert).



IGF-I	+	-	+	-	+	-	+	-
Ad-E2F-1	+	+	+	+	-	-	-	-
Ad-p21	+	+	-	-	-	-	-	-
Ad-Luc	-	-	-	-	+	+	-	-
mock infected	-	-	-	-	-	-	+	+

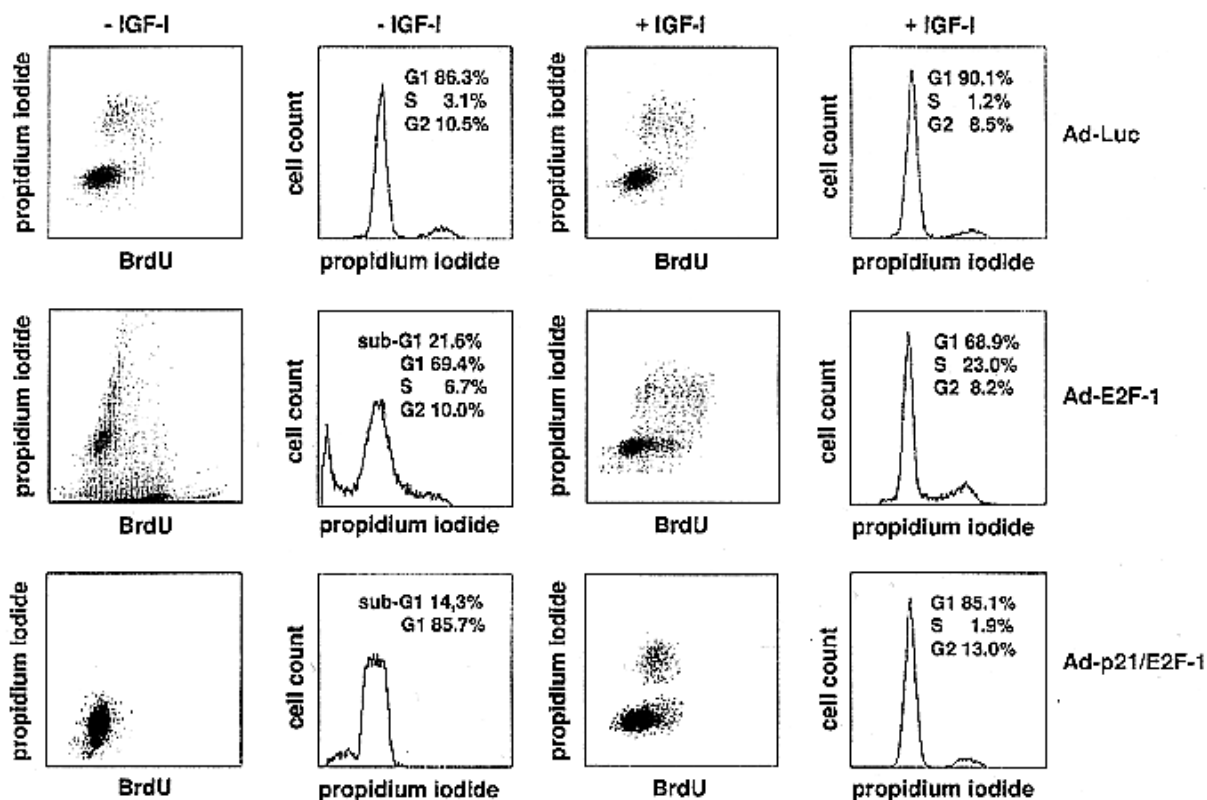
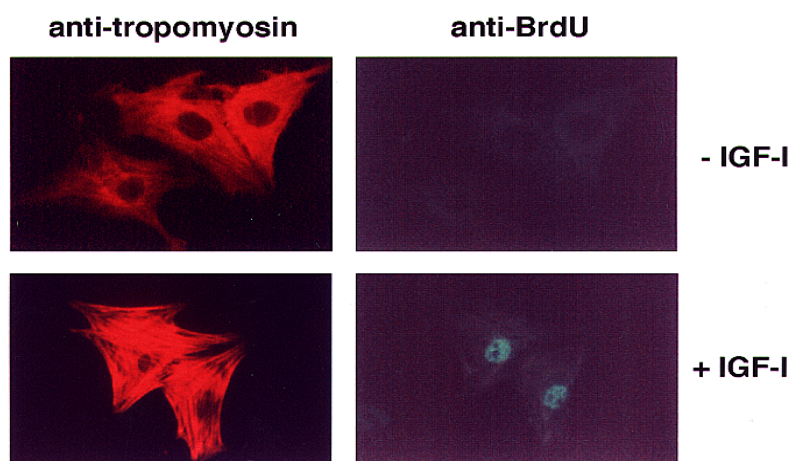
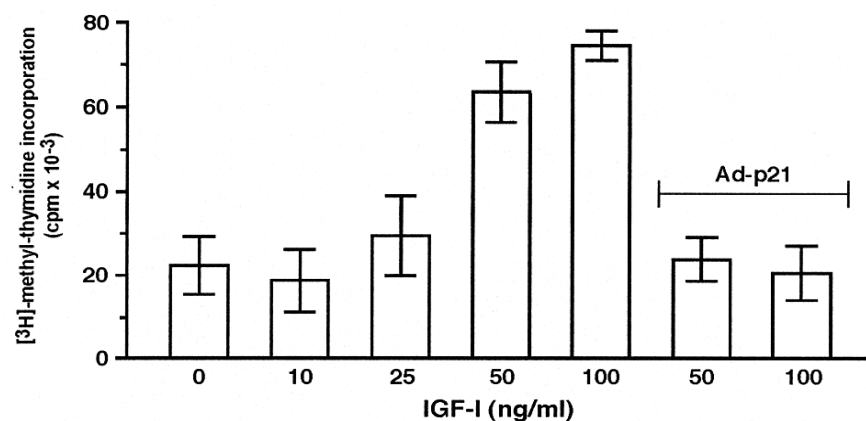
**Abbildung 19:** IGF-I induziert die Kinase-Aktivität von cdk2, cdk4 und cdk6 in Kardiomyozyten, die E2F-1 überexprimieren. Zellextrakte (500 µg Gesamtprotein) wurden mit Antikörpern gegen cdk2, cdk4 oder cdk6 immunpräzipitiert. Die Kinaseaktivität wurde bestimmt unter Verwendung von Histon H1 (für cdk2) oder rekombinatem pRb Protein (für cdk4 oder cdk6) als Substrat. Die Menge inkorporierter Radioaktivität wurde mittels SDS-PAGE ermittelt und in einem Phosphorimager mit TINA Software analysiert. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind dargestellt zusammen mit der quantitativen Bestimmung durch Pooling von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM), y-Achse: Werte in cpm  $\times 10^{-3}$ , schwarze Balken: ohne IGF-I; weiße Balken: mit IGF-I.

### *In der Anwesenheit von IGF-I induziert E2F-1 S-Phase in Kardiomyozyten*

In der nächsten Serie von Experimenten wurde untersucht, ob der Effekt von E2F-1 und IGF-I auf Zellzyklus regulierende Faktoren von einem Wiedereintritt in den Zellzyklus begleitet wird, der sich in der Induktion der DNA-Synthese widerspiegelt. [3H]-Methyl-Thymidin-Einbau wurde angewandt, um den Effekt von IGF-I auf E2F-1 überexprimierende Kardiomyozyten zu quantifizieren. Wie in Abbildung 20A dargestellt kam es dabei zu einem dosisabhängigen Anstieg der [3H]-Methyl-Thymidin-Einbaurate, was durch parallele Überexpression von p21<sup>CIP1</sup> antagonisiert werden konnte.

Um festzustellen, ob die DNA-Synthese tatsächlich speziell in Kardiomyozyten induziert wird, wurde eine Doppel-Immunfärbung durchgeführt, um BrdU-Einbau als Zeichen von DNA-Synthese in Kardiomyozyten, die durch anti-sarkomeres Tropomyosin Antikörper identifiziert wurden, festzustellen (Abb. 20B). 24 Stunden nach Infektion war die adenoviral vermittelte Überexpression von E2F-1 nicht ausreichend, um DNA-Synthese in Kardiomyozyten zu bewirken. 5% der scheininfizierten, 3% der mit Ad-Luc infizierten und 6% der mit Ad-E2F-1 infizierten Kardiomyozyten waren BrdU-positiv. Im Gegensatz hierzu führte der kombinierte Effekt von E2F-1 und IGF-I zur Induktion der DNA-Synthese, was in 20% BrdU-positiven Kardiomyozyten resultierte (Abb. 20B). Jedoch konnten zu keiner Zeit Kardiomyozyten mit typischen mitotischen Konfigurationen oder anderen Zeichen der Zellteilung identifiziert werden. Überexpression von p21<sup>CIP1</sup> führte zur Hemmung des kombinierten Effektes von IGF-I und E2F-1 auf den Einbau von BrdU.

Um die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen zu bestimmen, wurde FACS-Analyse von Kardiomyozyten, die mit Propidium Jodid und BrdU gefärbt wurden, angewandt. Weder in der Abwesenheit, noch in der Anwesenheit von IGF-I konnte mittels FACS eine Veränderung der Zellzyklusverteilung in mit Propidiumjodid gefärbten Kardiomyozyten, die mit Ad-Luc infiziert worden waren, festgestellt werden (Abb. 20C). Im Gegensatz hierzu kam es zu einem Anstieg der Zellen in der S-Phase auf 23%, wenn E2F-1 in der Anwesenheit von IGF-I überexprimiert wurde. Auch der Peak der apoptotischen Zellpopulation mit weniger als 2n DNA-Gehalt (sub-G1 Fraktion) verschwand. Überexpression von p21<sup>CIP1</sup> führte zur Abnahme der E2F-1-induzierten Apoptose um ein Drittel, was in Übereinstimmung ist mit der Beobachtung, daß p21<sup>CIP1</sup> in der Lage ist, Apoptose in C2C12 Myoblasten zu blockieren (Wang and Walsh, 1996). Außerdem war p21<sup>CIP1</sup> in der Lage, den Effekt von IGF-I auf die Zellzyklusaktivierung zu antagonisieren, was zu einer Abnahme der S-Phase Population von 23% auf 1.9% führte (Abb. 20C).



**Abbildung 20:** E2F-1 und IGF-I induzieren den Wiedereintritt in den Zellzyklus in Kardiomyozyten neonataler Ratten. Die Zellkulturen wurden mit Ad-E2F-1 infiziert und behandelt wie in Abbildung 16 beschrieben. **A**, [<sup>3</sup>H]-Methyl-Thymidin Inkorporation unter den angegebenen Dosen von IGF-I in E2F-1 überexprimierenden Kardiomyozyten (Mittelwert  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten). **B**, Zellkulturen wurden für 4 Stunden mit BrdU markiert 24 Stunden nach der Infektion mit Ad-E2F-1. Die auf den Objektträgern befindlichen Zellen wurden dann mit FITC-markiertem anti-BrdU Antikörper (grün) und kardiomyozyten-spezifischem anti-sarkomeren Tropomyosin Antikörper (rot) gefärbt. **C**, Zellen wurden trypsinisiert und in 70%-igem Äthanol fixiert. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen anschließend mit Propidium Jodid gefärbt und mit FACS analysiert. Unter Verwendung von Multicycle Software (Coulter) wurde der Prozentsatz der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen bestimmt und in der Abbildung dargestellt. Das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes ist dargestellt.

### 3.4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, daß E2F-1 in Kombination mit IGF-I den Zellzyklus in postmitotischen primären Kardiomyozyten induzieren kann. Dies geht mit der spezifischen Herabregulation von p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> einher und der Freisetzung aktiver cdk-Komplexe, was auf eine bedeutende Rolle dieser beiden Zellzyklusinhibitoren für die Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrestes differenzierter Kardiomyozyten hinweist.

Die Fähigkeit, E2F-1- oder E1A-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten zu blockieren, wurde bereits durch Überexpression des viralen Proteins E1B demonstriert (Kirshenbaum et al., 1996; Kirshenbaum and Schneider, 1995; Liu and Kitsis, 1996). Dennoch, bis jetzt war es unklar, ob irgendwelche physiologische Faktoren existieren, die den Zellzyklus in postmitotischen Kardiomyozyten veranlassen und als solche als interessante Objekte für zukünftige interventionelle Studien geeignet sind, die die kardiale Regeneration auf molekularer Ebene zum Ziel haben. Deshalb stand im Fokus dieser Arbeit die Funktion von IGF-I, da es als Mediator von Wachstumshormon für den günstigen Effekten von Wachstumshormon bei Patienten mit Herzinsuffizienz verantwortlich zu sein scheint (Osterziel et al., 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß in postmitotischen Kardiomyozyten IGF-I allein weder einen Effekt auf die Expression und Aktivität von Zellzyklusfaktoren aufweist, noch zur Induktion von DNA-Synthese führt. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die IGF-I das Potential zuschreiben, direkt DNA-Synthese in Kardiomyozyten zu induzieren (Kajstura et al., 1994; Reiss et al., 1996). Der Grund für die Diskrepanz zwischen den Daten der hier vorgelegten Arbeit und den erwähnten Studien ist unklar. Es sei in diesem Zusammenhang allerdings erwähnt, daß Kajstura et al. in Kardiomyozyten, die mit IGF-I behandelt wurden, einen Anstieg des Einbaus von BrdU von 1% auf lediglich 6% beobachteten (Kajstura et al., 1994). Diese Rate an BrdU-Einbau konnten wir bereits in unseren unstimulierten Kontroll-Kulturen beobachten. Außerdem präsentieren die Autoren in dieser Arbeit keine quantitativen oder funktionellen Daten bestimmter molekularer Marker des Zellzyklus, die ihre Ergebnisse erhärten. Dies trifft leider auch für die Arbeit von Reiss et al. zu, in der die Autoren den Phänotyp transgener Mäuse, die im Myokard lokal IGF-I überexprimieren,

präsentieren (Reiss et al., 1996). Obwohl es sich hierbei um eine elegant durchgeführte Studie handelt, so ist doch zu bedenken, daß ein Modell mit einer hohen und kontinuierlichen Überexpression von IGF-I im Myokard nur eine begrenzte Aussagekraft für den Effekt physiologischer Serumspiegel von IGF-I aufs Myokard haben wird. Schließlich sind die hier vorgelegten Ergebnisse in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die ebenfalls keinen Effekt von IGF-I, IGF-II, oder dem intrazellulären Mediator von IGF-I H-Ras, auf die Zellzyklusmaschinerie kultivierter Rattenkardiomyozyten nachweisen konnten (Ito et al., 1993; Liu et al., 1996; Thorburn et al., 1993). Es wäre interessant zu testen, welchen Einfluß andere bekannte kardiale Wachstumsfaktoren auf Apoptose und Mitogenese kardialer Myozyten haben. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß Angiotensin II wohl nicht in der Lage ist, DNA-Synthese in Kardiomyozyten zu erzeugen, obwohl es zu einer transienten Expression und Aktivierung von Zyklinen und cdk's führte (Sadoshima et al., 1997).

Schließlich wäre es von großer Bedeutung zu verstehen, über welche intrazellulären Signalwege IGF-I seinen anti-apoptotischen Effekt auf Kardiomyozyten ausübt. So konnten einige Studien bereits eine wichtige Rolle für die Proteinkinase B/Akt in PC12 Phäochromozytomzellen (Parrizas et al., 1997) und in Rat-1 Fibroblasten (Kulik et al., 1997) nachweisen. Daneben scheint es aber auch andere Proteinkinase B-unabhängige anti-apoptotische Signalwege zu geben, die durch IGF-I aktiviert werden (Kulik and Weber, 1998), einer davon scheint über die Aktivierung von MAP (Mitogen-Aktivierte-Protein)-Kinasen zu laufen (Parrizas et al., 1997). Weiterhin konnte kürzlich in einem Modell der Induktion von Apoptose durch Serumentzug oder Behandlung mit Doxorubicin demonstriert werden, daß IGF-I in fötalen Kardiomyozyten die Induktion des pro-apoptotischen Faktors Bax und die Aktivierung der Kaspase 3 antagonisieren kann (Wang et al., 1998). Allerdings ist nachwievor unklar, wie IGF-I seinen anti-apoptotischen Effekt in post-mitotischen Kardiomyozyten ausübt und es besteht ein großer Bedarf an weiteren Studien, die dieses wichtige Thema zu klären versuchen.

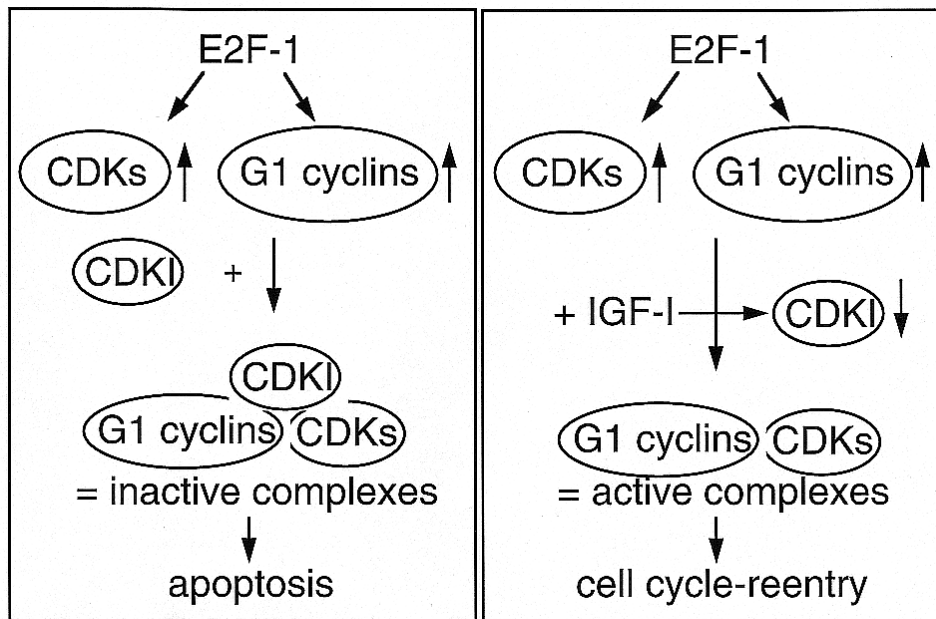
Man könnte argumentieren, daß die Zellzykluskontrolle in neonatalen unterschiedlich ist zu der adulter, voll differenzierter Kardiomyozyten, da die ersteren *in vivo* immer noch DNA-Synthese und Karyokinese vollziehen können (Kang and Koh, 1997; Soonpaa et al., 1996; Zak, 1974). Obwohl dies für *in vivo*-Verhältnisse zutreffen mag, so gilt dies sicherlich nicht für *in vitro*-Bedingungen wie sie in dieser Arbeit angewandt wurden. DNA-Gehalt und der Assay zur Inkorporation von Nukleotiden zeigen eindeutig, daß nur eine sehr geringe Anzahl neonataler Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen in die S-Phase gehen (weniger als 5%). Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Studien, die ebenfalls belegten, daß neonatale (Sadoshima et al., 1997) und sogar fötale (Kaplan et al., 1998; Liu and Kitsis, 1996) Kardiomyozyten ihre proliferative Kapazität verlieren, in dem Moment, wo sie in Kultur genommen werden.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß Überexpression von E2F-1 zur Apoptose in Kardiomyozyten führt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die den

Phänotyp von E2F-1-*knock-out* Mäusen beschreiben (Field et al., 1996), transgenen Mäusen, die E2F-1 überexprimieren (Holmberg et al., 1998) und *in vitro*-Studien mit Überexpression von E2F-1 in Fibroblasten-Zelllinien (DeGregori et al., 1997), die alle belegen, daß E2F-1 Apoptose erzeugt. Kürzlich wurde in zwei weiteren Arbeiten gezeigt, daß sogar in Kardiomyozyten die Überexpression von E2F-1 zur Apoptose führt (Agah et al., 1997; Kirshenbaum et al., 1996). Wie in der hier vorgelegten Arbeit war auch bei diesen Studien die gleichzeitige Anwesenheit eines anti-apoptotischen Faktors (E1B oder Bcl-2) vonnöten, um Apoptose zu verhindern und DNA-Synthese zu erreichen. Obwohl zwischen der hier vorgelegten Arbeit und den erwähnten Studien keine qualitativen Unterschiede bestehen, so gibt es doch mehrere Gründe, die die offensichtlichen quantitativen Unterschiede erklären können. So wurden in diesen Studien andere Methoden zum Nachweis der Apoptose und DNA-Synthese angewandt, der Zeitpunkt zur Messung der DNA-Synthese war deutlich später und es wurde eine andere Methode der Infektion der Kardiomyozyten mit Adenoviren eingesetzt.

Die Induktion von Apoptose kann durch die Aktivität von Zytokinen oder anderen Faktoren wirksam beeinflusst werden. So haben andere Studien zeigen können, daß c-myc induzierte Apoptose durch ein zweites, durch Zytokine vermitteltes Signal blockiert werden kann, was insbesondere für IGF-I zutrifft (Harrington et al., 1994). Weiterhin haben verschiedene Studien unter Verwendung aktivierter T-Lymphozyten gezeigt, daß ein zusätzliches Signal erforderlich ist, um Apoptose zu verhindern und S-Phase Eintritt zu ermöglichen (Firpo et al., 1994; Kaplan et al., 1998). Die hier vorgelegten Ergebnisse und andere Studien haben gezeigt, daß diese Signale in der Herabregulation von cdk-Inhibitoren konvergieren, insbesondere von p27<sup>KIP1</sup> (Coats et al., 1996; Kaplan et al., 1998; Leone et al., 1997; Mann et al., 1997; Reynisdottir and Massague, 1997; Winston et al., 1996). Die Herabregulation von cdk-Inhibitoren führt zur Freisetzung aktiver cdk-Komplexe, was zur Progression des Zellzyklus führt (Abb. 21). Deshalb liefert das hier vorgestellte Modell einen Mechanismus, über den frühere Ergebnisse zur Induktion von S-Phase durch E1A in Kardiomyozyten erklärt werden können (Kirshenbaum and Schneider, 1995; Liu and Kitsis, 1996), da das virale Onkoprotein E1A direkt an p27<sup>KIP1</sup> bindet und seine inhibitorische Aktivität blockiert (Mal et al., 1996).

Schlußfolgernd läßt sich sagen, daß die hier vorgelegten Ergebnisse belegen, daß die cdk-Inhibitoren p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> eine Schlüsselrolle für den Zellzyklusarrest postmitotischer Kardiomyozyten zu spielen scheinen und daß ihre Präsenz für die Modulation einer apoptotischen versus mitogenen Antwort von Bedeutung ist.



**Abbildung 21:** Modell zur Darstellung des Effektes von E2F-1 in Kardiomyozyten in der Ab-, bzw. Anwesenheit von IGF-I.

#### 4. Dritter Abschnitt: Signalwege des programmierten Zelltods in Kardiomyozyten induziert durch freie Sauerstoffradikale

##### 4.1 Einleitung

Die Rolle der Apoptose für die Entwicklung, als auch für die Erkrankung des Myokards wurde in zahlreichen Untersuchungen nahegelegt. Dies basiert hauptsächlich auf Beobachtungen, die einen Gipfel der Apoptoserate in der perinatalen Periode beschreiben (Kajstura et al., 1995) und Apoptose nur in bestimmten Regionen des Myokards entdeckten (James, 1994). Schließlich wurde eine Assoziation zwischen dem Auftreten eines Myokardinfarktes und dem der Apoptose sowohl bei der Ratte (Kajstura et al., 1996), als auch beim Menschen (Itoh et al., 1995) nachgewiesen. Weiterhin wird vermehrte Apoptose bei Patienten mit unterschiedlichen Rhythmusstörungen beobachtet (James, 1994), als auch bei Patienten mit Kardiomyopathien einschließlich des arrhythmogenen rechten Ventrikels (Mallat et al., 1996) und der dilatativen Kardiomyopathie (Narula et al., 1996). Diese Arbeiten sind nicht nur deswegen von Bedeutung, weil durch sie der Nachweis der Apoptose in einem weiteren Organ gelang, sondern weil sie belegen, daß beide, mitotische wie post-mitotische Zellen, zur Induktion von Apoptose fähig sind. Allerdings existiert bislang kaum Information über mögliche Stimuli der myokardialen Apoptose.

Interessanterweise konnte Apoptose nach Reperfusion und Ischämie in mehreren Organen einschließlich dem Myokard nachgewiesen werden (Gottlieb et al., 1994). Jedoch ist bislang unklar, wodurch es hierbei zur Induktion von Apoptose kommt. Experimentelle Studien unter Verwendung isolierter Organpräparationen oder in vivo-Tiermodelle konnten die Generierung von Sauerstoffradikalen (ROS) während Ischämie und Reperfusion nachweisen (Zweier et al., 1987).



Diesbezüglich gibt es eine Vielzahl verschiedener klinischer Situationen, die durch die Induktion von Ischämie und Reperfusion einerseits und der Generierung von ROS andererseits assoziiert sind. Dazu zählen Bypass-Operationen (Krukenkamp et al., 1994), Thrombembolien (Davies et al., 1990) und koronare Angioplastien (Roberts et al., 1990). Die Gefahr für die Organintegrität, die ROS ausüben, wurde kürzlich besonders für das Myokard evident, da eine frühe Letalität und Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie in *knock-out*-Mäusen zu beobachten war, in denen das Gen der mitochondrialen Superoxid-Dismutase inaktiviert wurde (Li et al., 1995). Dennoch, bislang bleibt es unklar, über welche intrazellulären Signaltransduktionswege ROS diesen pathologischen Phänotyp induzieren.

Dieser Abschnitt der vorgelegten Arbeit beschreibt unter Verwendung eines Zellkulturmodells kardialer Zellen und verschiedener ROS-generierender Systeme Ergebnisse eigener Experimente, die das Ziel hatten, zu untersuchen, ob ROS Apoptose in kardialen Zellen erzeugen können und über welche Signalkaskade dieser Effekt ausgelöst wird.

## **4.2 Methoden**

### *Zellkulturen*

Die Präparation von Zellkulturen isolierter neonataler Rattenkardiomyozyten erfolgte wie unter 3.2 beschrieben.

### *Exposition der Zellen mit ROS-generierenden Systemen*

Die kultivierten Zellen wurden zweifach mit HBSS (*Hank's buffered salt solution*) bei 37° Celsius gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden für eine Stunde bei 37° Celsius in HBSS inkubiert, das die angegebenen Mengen an Xanthin-Oxidase plus Xanthin (XO/X) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus FeSO<sub>4</sub> enthielt. Wenn Superoxid-Dismutase (SOD), oder Catalase (CAT) oder Tiron benutzt wurden, so wurden diese simultan mit XO/X verabreicht. Weder SOD, noch CAT hatten einen Effekt auf die Zellkulturen in Abwesenheit von XO/X (Daten nicht dargestellt). Der Kaspase-Inhibitor Z-VAD-fmk wurde 2 Stunden vor und direkt nach der Behandlung mit ROS zugegeben.

### *Bestimmung der Zellvitalität*

Die Zellvitalität von Zellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt worden waren, wurde mittels MTT-Test evaluiert (MTT = 3-(4,5-Dimethyl-Thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid). Hierzu wurde ein Kit (Boehringer Mannheim) eingesetzt und die Methode wurde nach den Kit-Instruktionen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in 96-Lochplatten in einem Endvolumen von 100 µL in Kulturmedium gehalten. Nach der Behandlung mit ROS wurden 10 µL des MTT-Markierungsreagenz zu jedem Loch zugegeben und für 4 Stunden bei 37° Celsius inkubiert. Daraufhin wurden 100 µL des Löslichkeits-Puffers zu jedem Loch zugegeben und bei 37° Celsius

über Nacht kultiviert. Die optische Dichte wurde spektrophotometrisch bei 570 nm ermittelt. Die Zellvitalität nach Behandlung mit XO/X wurde mittels Trypanblau-Ausschluß ermittelt.

#### *Zelltod-ELISA*

Dieser ELISA wurde nach den Instruktionen des Herstellers (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Der monoklonale Anti-Histon Antikörper wurde jedem Loch der 96-Lochplatten zugegeben und über Nacht bei 4° Celsius inkubiert. Nach erneutem "Coating" der Platten und dreifachem Waschen wurden die zytoplasmatischen Zellfraktionen in die Löcher gegeben und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die gebundenen Nukleosomen durch Zugabe eines monoklonalen Anti-DNA-Peroxidase Antikörpers präzipitiert, der für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach der Zugabe des Substrates wurde die optische Dichte mittels ELISA-Reader's bei 405 nm abgelesen.

#### *In situ nick end-Labeling und Färbung mit Propidium Jodid*

Der immunzytologische Nachweis von Apoptose durch den TUNEL-Assay erfolgte wie unter 3.2 beschrieben.

#### *Immunoblot-Analyse*

Die Zellen wurden für ein Stunde bei 4° Celsius in Lysis-Puffer inkubiert (20 mmol/L Tris, pH 7.5, 2 mmol/L EDTA, 3 mmol/L EGTA, 2 mmol/L DTT, 250 mmol/L Sucrose, 0.1 mmol/L PMSF, 1 % Triton X-100, jeweils 10 µg/mL Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A). 50 µg Protein enthaltende Proben wurden auf ein 12% SDS-PAGE aufgetragen und auf Nitrocellulosemembran übertragen. Gleiche Konzentration an Protein wurde mittels Ponceau-Rot-Färbung der Membranen ermittelt. Nach der Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern folgte die Zugabe von Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Kaninchen-anti-Maus-IgG oder Esel-anti-Ziege-IgG (alle Amersham). Antigen-Antikörper-Komplexe wurden sichtbar gemacht durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL).

#### *Präparation von subzellulären Fraktionen*

Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und das Pellet wurde in 0.5 mL Puffer suspendiert (20 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.5, 250 mmol/L Sucrose, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L Phenylmethylsulfonyl-Fluorid, jeweils 10 µg/mL Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A). Darin wurden die Zellen in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Die subzellulären Fraktionen wurden gewonnen wie andernorts beschrieben (Yang et al., 1997). Hierbei wurde das Homogenisat zweimal bei 4° Celsius für 5 Minuten mit 750 g zentrifugiert, um Nuklei und nicht-aufgebrochene Zellen zu sammeln. Der Überstand wurde bei 4° Celsius für 15 Minuten mit 10.000 g zentrifugiert, um die schwere Membranen enthaltenden Zellbestandteile (HM) zu sammeln. Der daraus resultierende Überstand wurde bei 4°

Celsius für 1 Stunde mit 100.000 g zentrifugiert, um für die Zellbestandteile mit leichten Membranen (LM) anzureichern. Der endgültige Überstand repräsentierte die zytosolische Fraktion. Die Proben wurden jeweils bei -80° Celsius gelagert. Um die Verteilung von Mitochondrien und Lysosomen in den subzellulären Fraktionen nachzuweisen, wurde die Aktivität der Monoamin-Oxidase, ein Markerenzym für Mitochondrien, bzw. der sauren Phosphatase, ein Markerenzym der Lysosomen, in den subzellulären Fraktionen bestimmt. Die Aktivität der Monoamin-Oxidase wurde nach einer andernorts beschriebenen Methode vollzogen (Catravas et al., 1977). Dieser Assay wurde bei Raumtemperatur in einem Puffer durchgeführt, der 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.22 mmol/L Kynuramin und 80  $\mu$ mol/L  $MgCl_2$  enthielt. Die Reaktion wurde terminiert durch Zugabe von 0.5 mol/L NaOH und 10 %  $ZnSO_4$ . Das Reaktionsprodukt wurde spektrophotometrisch als Grad der Absorption bei 330 nm gemessen, wobei 4-Hydroxyquinolin als Standard diente. Die Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase erfolgte nach einem bereits anderenorts beschriebenen Protokoll (Absolom, 1986). Dieser Assay wurde gestartet durch Inkubation in einem Puffer mit 100 mmol/L Natrium-Acetat, pH 4.5, 4.5 mmol/L p-Nitrophenyl-Phosphat und 0.05 % Triton X-100. Der Assay wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und durch Zugabe von 2 mol/L NaOH terminiert. Die Absorption wurde bei 405 nm bestimmt. Monoamin-Oxidase Aktivität repräsentierte  $92.5 \pm 2.2$  % (n=3) der gesamten Enzymaktivität in den HM-Fraktionen und nur  $6.3 \pm 3.8$  % in den LM-Fraktionen, wogegen die Aktivität der sauren Phosphatase  $24.7 \pm 8.5$  % (n=3) der gesamten Enzymaktivität in der HM-Fraktion und  $72.2 \pm 8.4$  % in der LM-Fraktion ausmachte. Diese Daten belegen, daß der weitaus größte Anteil der Mitochondrien sich in der HM-Fraktion befand.

### *Immunpräzipitation*

HM- oder LM-Fraktionen wurden in Puffer resuspendiert (10 mmol/L HEPES, pH 7.4, 38 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L PMSF, jeweils 10  $\mu$ g/mL Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A) und in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Um Immunpräzipitationen durchführen zu können, wurde das Zytosol oder die HM- oder LM-Fraktion in 10 % (V/V) Protein A-Agarose auf einer Schaukelplattform für eine Stunde vorgereinigt. Nun wurden die spezifischen Antikörper zugegeben und für eine weitere Stunde auf der Schaukelplattform inkubiert. Anschließend wurden die Immunpräzipitate durch eine weitere Stunde Inkubation mit 10% (V/V) Protein A-Agarose gesammelt. Die Agarose-Kügelchen wurden herunterzentrifugiert und dreimal mit NET-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von SDS-Puffer wurden die Antigene freigesetzt und denaturiert. Immunoblot-Analyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

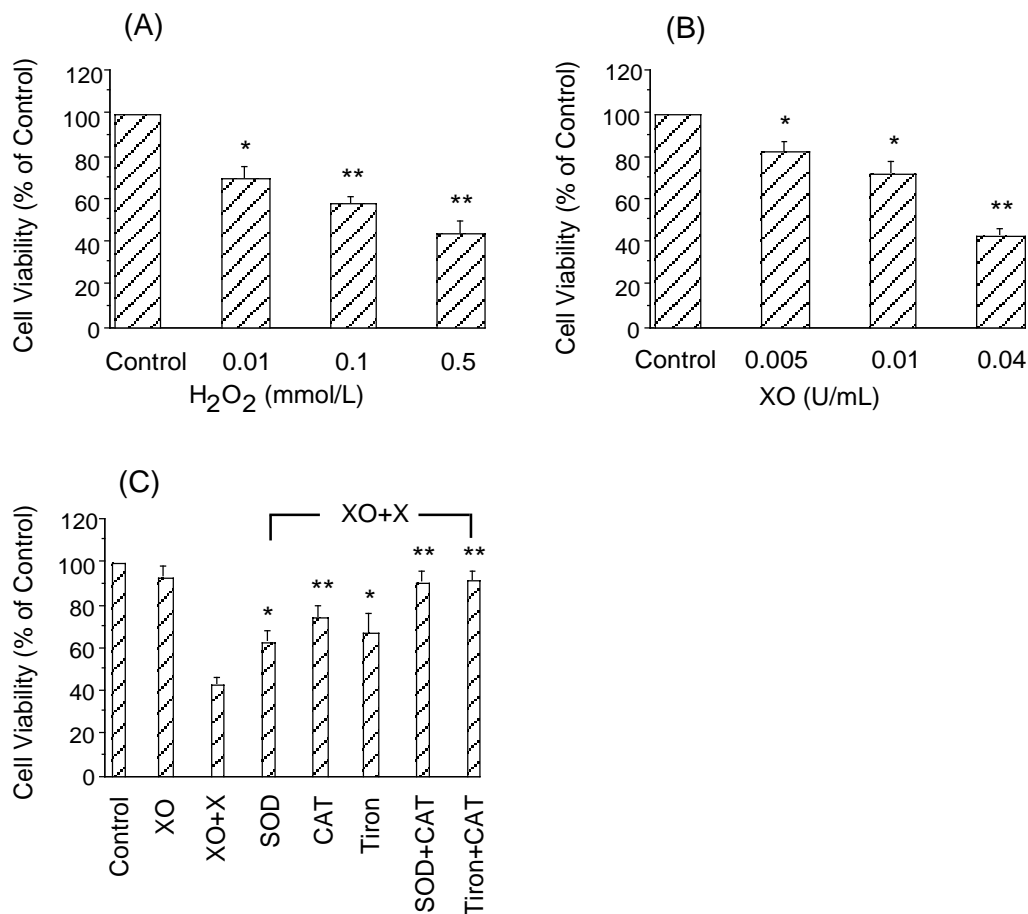
### *Statistik*

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von mindestens 3 repräsentativen Experimenten. Gepaarte Daten wurden mittels Student's t-Test analysiert. ANOVA wurde verwandt für multiple Vergleiche. Ein p-Wert < 0.5 wurde als signifikant erachtet.

### 4.3 Ergebnisse

#### *ROS induzieren Tod in kardialen Zellen*

Exposition isolierter kardialer Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte zu einer dosis-abhängigen Reduktion der Zellvitalität, die mittels MTT-Assay ermittelt wurde (Abb. 22A). Xanthin-Oxidase plus 0.1 mmol/L Xanthin (XO/X) wurde verwandt, um  $\text{O}_2^-$  zu erzeugen und die entsprechende Zellvitalität wurde mittels Trypanblau-Ausschluß bestimmt, da XO/X selbst mit der MTT-Reaktion interferieren kann. Auch mit XO/X konnte eine dosis-abhängige Reduktion der Zellvitalität beobachtet werden (Abb. 22B). Da XO/X zur Bildung sowohl von  $\text{O}_2^-$ , als auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt, wurden SOD, CAT oder Tiron zugegeben, um den Anteil des jeweiligen ROS am XO/X-induzierten Zelltod zu ermitteln (Abbildung 22C). In der Anwesenheit von SOD war der Effekt von XO/X partiell reversibel, was darauf hinwies, daß  $\text{O}_2^-$  zum XO/X-induzierten Zelltod beitrug. Dies wurde erhärtet durch die alternative Zugabe von Tiron, einem zellmembrandurchlässigen Fänger von  $\text{O}_2^-$ . Die Anwesenheit von CAT hatte einen ähnlichen Effekt auf die Zellvitalität wie SOD. Die Kombination von CAT mit SOD oder Tiron führte zur kompletten Aufhebung der toxischen Wirkung von XO/X. Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{O}_2^-$  oder beide zur Induktion von Zelltod in kardialen Zellen führen können.

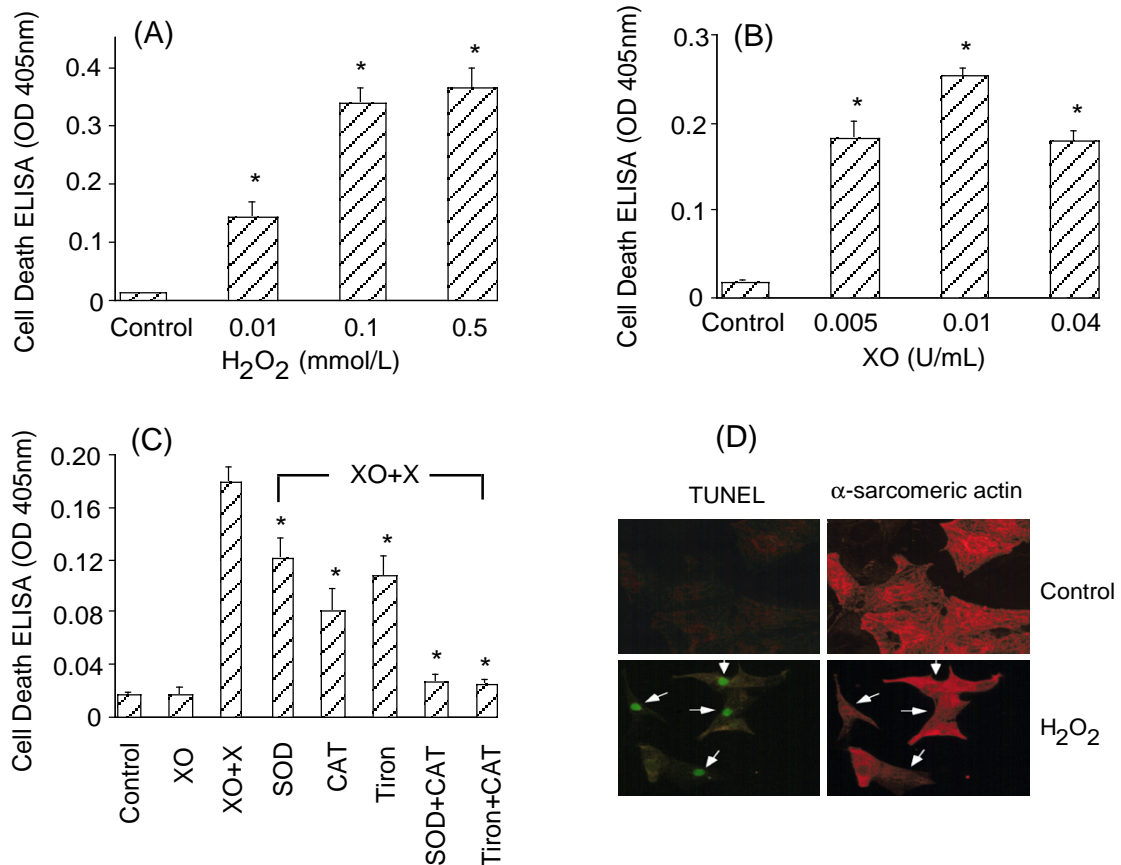


**Abbildung 22:** Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder XO/X auf die Lebensfähigkeit kardialer Zellen. **A**, die Lebensfähigkeit wurde mittels MTT-Assay bestimmt, nachdem die Zellen für 1 Stunde mit den angegebenen Dosen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  plus 0.1 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  behandelt und für weitere 19 Stunden in ROS-freiem Medium kultiviert wurden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ( $\pm$  SEM) von drei unabhängigen Experimenten ( $n = 16$  Slots in jedem individuellen Experiment); \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen. **B**, die Lebensfähigkeit wurde mittels Ausschluß von Trypanblau bestimmt, nachdem die Zellen für 1 Stunde mit den angegebenen Dosen von XO plus 0.1 mmol/L Xanthin behandelt und für weitere 7 Stunden in ROS-freiem Medium kultiviert wurden; \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen. **C**, Zellen wurden mit 0.04 U/ml XO plus 0.1 mmol/L Xanthin in der Anwesenheit von 1000 U/mL Superoxid-Dismutase (SOD), oder 500 U/mL Catalase (CAT), oder 1 mmol/L Tiron exponiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Experimenten in Duplikat; \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.02$ , verglichen mit XO/X.

### *ROS induzieren Apoptose in Kardiomyozyten*

Die Frage war nun, ob ROS Zelltod über die Induktion von Apoptose in kardialen Zellen erzeugen. Die Anwendung eines Zelltod-ELISA's, der spezifisch Histon-assoziierte DNA-Fragmente im Zytosol stimulierter Zellen detektiert, zeigte einen dosis-abhängigen Anstieg von Oligonukleosomen im Zytosol von Zellen, die mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt worden waren (Abb. 23A). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Behandlung der Zellen mit XO/X (Abb. 23B). Zugabe von SOD, CAT oder Tiron minderten den Effekt von XO/X und die Kombination von CAT mit SOD oder Tiron konnte den Effekt von XO/X nahezu komplett aufheben (Abb. 23C).

Um festzustellen, ob Apoptose auch in Kardiomyozyten stattfindet, deren Zellkultur immer durch einen gewissen Anteil kardialer Nicht-Kardiomyozyten (vornehmlich kardiale Fibroblasten) kontaminiert ist, wurde *in situ* nick end-labeling (TUNEL) in Kombination mit Propidium Jodid-Färbung und Immunfluoreszenz angewandt (Abb. 23D). Die Ergebnisse belegen nach einer Behandlung mit 0.1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Anwesenheit apoptotischer Kardiomyozyten (TUNEL positiv) durch eine simultane Färbung mit  $\alpha$ -sarkomerem Actin. Vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt durch 0.04 U/mL Xanthin-Oxidase in Anwesenheit von 0.1 mmol/L Xanthin und 500 U/ml CAT. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{O}_2^-$  oder beide in der Lage sind, Apoptose in Kardiomyozyten zu erzeugen.

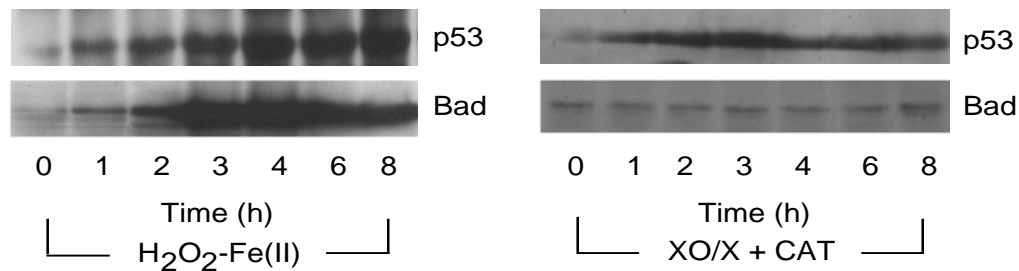


**Abbildung 23:** Bestimmung von ROS-induzierter Apoptose in kardialen Zellen. DNA-Fragmentierung wurde mittels ELISA bestimmt, wobei die Zellen wie in Abb. 22 beschrieben behandelt wurden unter Verwendung der angegebenen Dosen von **A**,  $H_2O_2$  oder **B**, XO/X oder **C**, mit 0.04 U/ml XO plus 0.1 mmol/L Xanthin in der Anwesenheit von SOD (1000 U/ml), oder Tiron (1 mmol/L), und/oder CAT (500 U/ml). Die Histon-assoziierten DNA-Fragmente werden als optische Dichte bei 405 nm präsentiert (Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Messungen in Triplikat); \* $p < 0.05$ , verglichen mit der Kontrolle. **D**, TUNEL (grün) und Immunfluoreszenz mit anti-sarkomerem Tropomyosin Antikörper (rot) von kardialen Kontrollzellen und stimulierten kardialen Zellen. Die kultivierten Zellen wurden mit 0.1 mmol/L  $H_2O_2$  plus 0.1 mmol/L  $FeSO_4$  stimuliert wie in Abb. 22 beschrieben. Pfeile deuten auf TUNEL-positive Kardiomyozyten.

#### *Effekt von ROS auf die Expression von apoptose-relevanten Faktoren*

Die Induktion von Apoptose ist mit der Expression und/oder Aktivierung spezifischer Proteine assoziiert, die für die Ausführung des apoptotischen Programms verantwortlich sind. Prinzipiell sind eine ungeheuere Vielzahl verschiedener apoptotischer Signalwege möglich, je nach Stimulus und je nach betroffener Zellart. Um nun den Signalweg der ROS-induzierten Apoptose in Kardiomyozyten zu spezifizieren, wurden zunächst die Proteinkonzentrationen von vier verschiedenen bekannten apoptose-relevanten Faktoren mittels Immunoblot-Analyse bestimmt: Bcl-2, Bax, Bad und p53. Kardiomyozyten wurden mit  $H_2O_2$  oder XO/X plus CAT (zur Generierung von  $O_2^-$ ) behandelt. Sowohl  $H_2O_2$ , als auch  $O_2^-$  führten zur Expression von p53, die bereits 1 bis 2 Stunden nach Exposition ersichtlich war (Abb. 24). Allerdings bewirkte nur  $H_2O_2$  und nicht  $O_2^-$  die Expression von

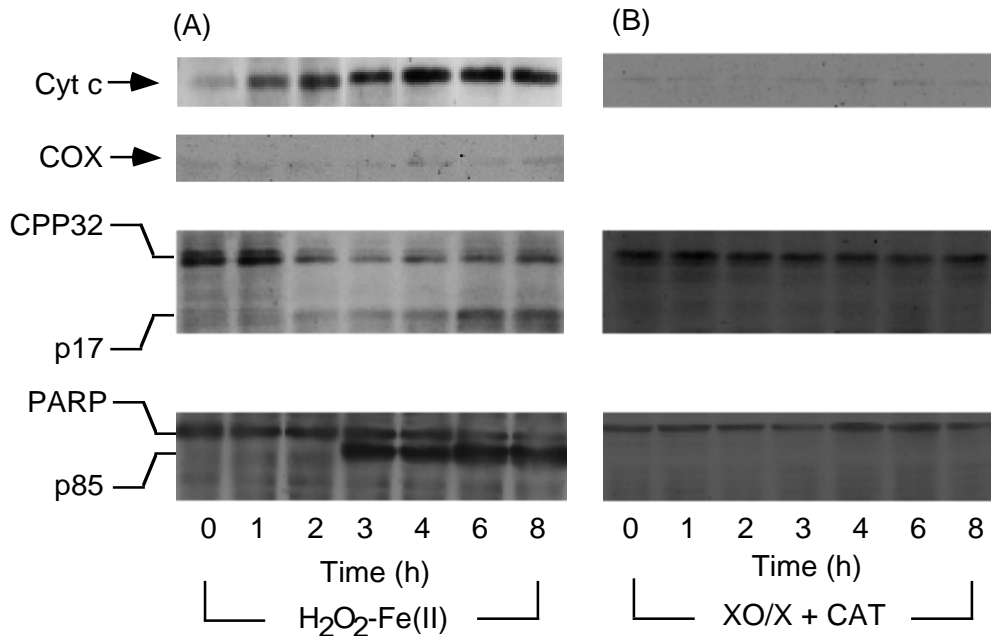
Bad (Abb. 24). Überraschenderweise führte weder die Behandlung mit  $H_2O_2$ , noch die mit  $O_2^-$  zur Induktion der Expression von Bcl-2 oder Bax in dem beobachteten Zeitraum von 8 Stunden (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 24:** Western-Blot Analyse der Expression von p53 und Bad in Kardiomyozyten, die mit 0.1 mmol/L  $H_2O_2$  plus 0.1 mmol/L  $FeSO_4$  oder mit 0.04 U/ml XO plus 0.1 mmol/L Xanthin in der Anwesenheit von 500 U/ml CAT stimuliert wurden. Die Zellen wurden für 1 Stunde stimuliert und anschließend in normalem Kulturmedium für die angegebene Zeit kultiviert. Dargestellt sind repräsentative Blots von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

#### *Differentieller Effekt von $H_2O_2$ und $O_2^-$ auf die Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung von Caspasen*

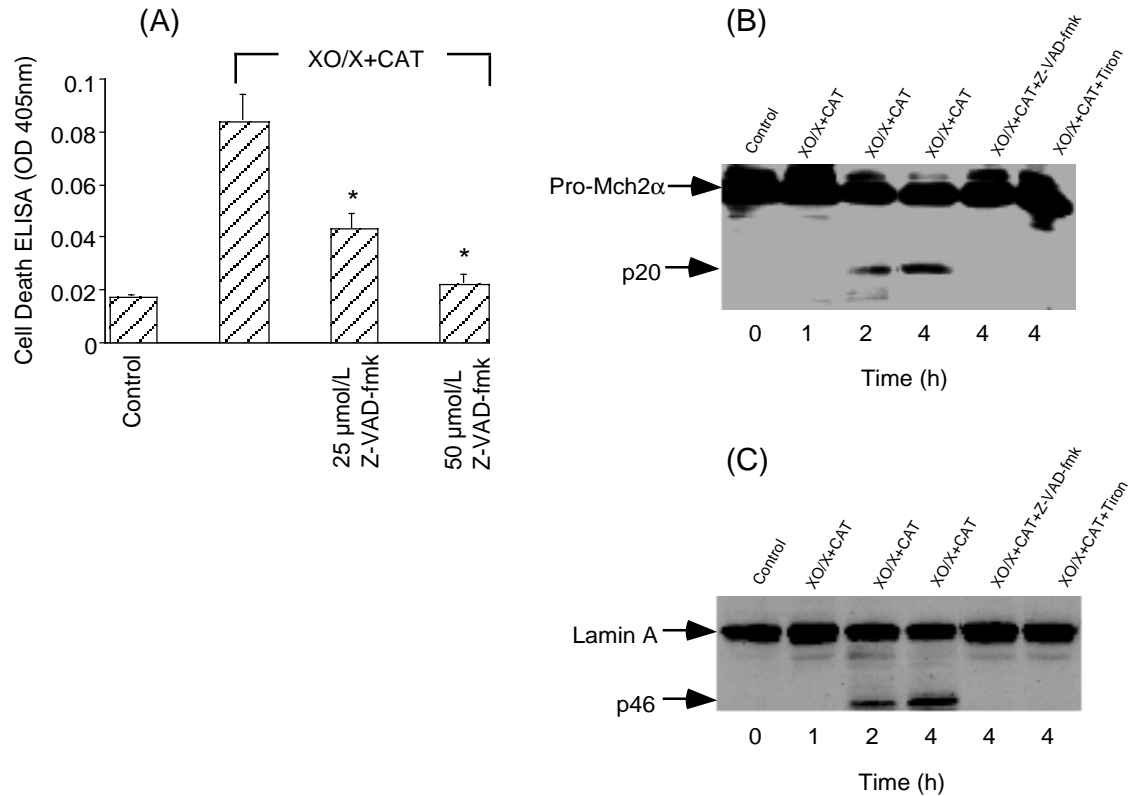
Als nächstes wurde die Verteilung von Cytochrom C in Kardiomyozyten bestimmt, die mit  $H_2O_2$  oder  $O_2^-$  stimuliert worden waren. Kürzlich wurde eine bedeutende Rolle der Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien ins Zytosol von Zellen als Mediator von apoptotischen Signalen diagnostiziert (Li et al., 1997; Liu et al., 1996). 1 bis 2 Stunden nach Stimulation mit  $H_2O_2$  wurde die Anwesenheit von Cytochrom C im Zytosol kultivierter Kardiomyozyten sichtbar (Abb. 25A). Um eine signifikante Kontamination der subzellulären Fraktion des Zytosols mit Mitochondrien als Ursache für den Nachweis von Cytochrom C auszuschließen, wurden die Blots mit einem Antikörper gegen die mitochondriale Cytochrom-Oxidase rehybridisiert (Abb. 25A). Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß Cytochrom-Oxidase in der zytosolischen Fraktion über den gesamten untersuchten Zeitraum nahezu nicht nachweisbar war. Die Freisetzung von Cytochrom C führt zur Aktivierung der Caspase CPP32. Diese Aktivierung läßt sich durch die Spaltung der inaktiven Form Pro-CPP32 in die aktive 17 kDa schwere Form nachweisen, wie sie 3 Stunden nach Behandlung mit  $H_2O_2$  sichtbar wurde (Abb. 25A). Auch ließ sich ein 85 kDa-Fragment von PARP 3 Stunden nach Exposition mit  $H_2O_2$  nachweisen, was ebenfalls als ein Indiz für die Aktivierung von CPP32 gewertet wird (Abb. 25A). Diese Daten belegen, daß Freisetzung von Cytochrom C und die nachfolgende Aktivierung von CPP32 Teil der durch  $H_2O_2$ -induzierten Apoptose von Kardiomyozyten darstellt.



**Abbildung 25:** Beteiligung der Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung von CPP32 in ROS-induzierter Apoptose von Kardiomyozyten. Dargestellt sind die Expressionswerte von Cytochrom C (cyt c) und Cytochrom Oxidase (cox) in den zytosolischen Extrakten, sowie die Aktivierung von CPP32 und Spaltung von PARP bestimmt durch Immunoblot-Analyse. Die Kardiomyozyten Kulturen wurden stimuliert mit **A**, 0.1 mmol/L  $H_2O_2$  plus 0.1 mmol/L  $FeSO_4$ , oder mit **B**, 0.04 U/ml XO plus 0.1 mmol/L Xanthin in der Anwesenheit von 500 U/ml CAT. Die Zellen wurden für 1 Stunde stimuliert und anschließend in normalem Kulturmedium für die angegebene Zeit kultiviert. Dargestellt sind repräsentative Blots von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Interessanterweise war die durch  $O_2^-$ -induzierte Apoptose von Kardiomyozyten weder durch Freisetzung von Cytochrom C, noch durch die Aktivierung von CPP32 und Spaltung von PARP gekennzeichnet (Abb. 25B). Allerdings führte die Anwesenheit eines Pan-Caspase-Inhibitors (Z-VAD-fmk) zur Aufhebung der  $O_2^-$ -induzierten Histon-assoziierten DNA-Fragmentierung (Abb. 26A). Dies belegt, daß  $O_2^-$  zur Aktivierung anderer Signalkaskaden, als die über Cytochrom C und CPP32, zur Induktion von Apoptose in Kardiomyozyten führt. Unter Verwendung eines Mch2 $\alpha$ -Antikörpers wurde gezeigt, daß die Caspase Mch2 $\alpha$  durch  $O_2^-$  aktiviert wurde, was sich durch die Bildung der aktiven Form von Mch2 $\alpha$ , p20, 2 Stunden nach Behandlung mit XO/X plus CAT nachweisen ließ (Abb. 26B). Zum selben Zeitpunkt wurde in diesen Zellen Lamin A, das ein Substrat von Mch2 $\alpha$  darstellt (Orth et al., 1996; Takahashi et al., 1996) in sein aktives 46 kDa Protein gespalten (Abb. 26C). Z-VAD-fmk führte zur Inhibierung von Mch2 $\alpha$ , was sich an der fehlenden Spaltung von Lamin A darstellte. Auch die Anwesenheit von Tiron verhinderte die Aktivierung von Mch2 $\alpha$ , wodurch auch hier die Spaltung von Lamin A ausblieb. Somit scheint  $O_2^-$ , anders als  $H_2O_2$ , zur Induktion von Apoptose in Kardiomyozyten Mch2 $\alpha$  zu aktivieren, was zur Spaltung von Lamin A führt.





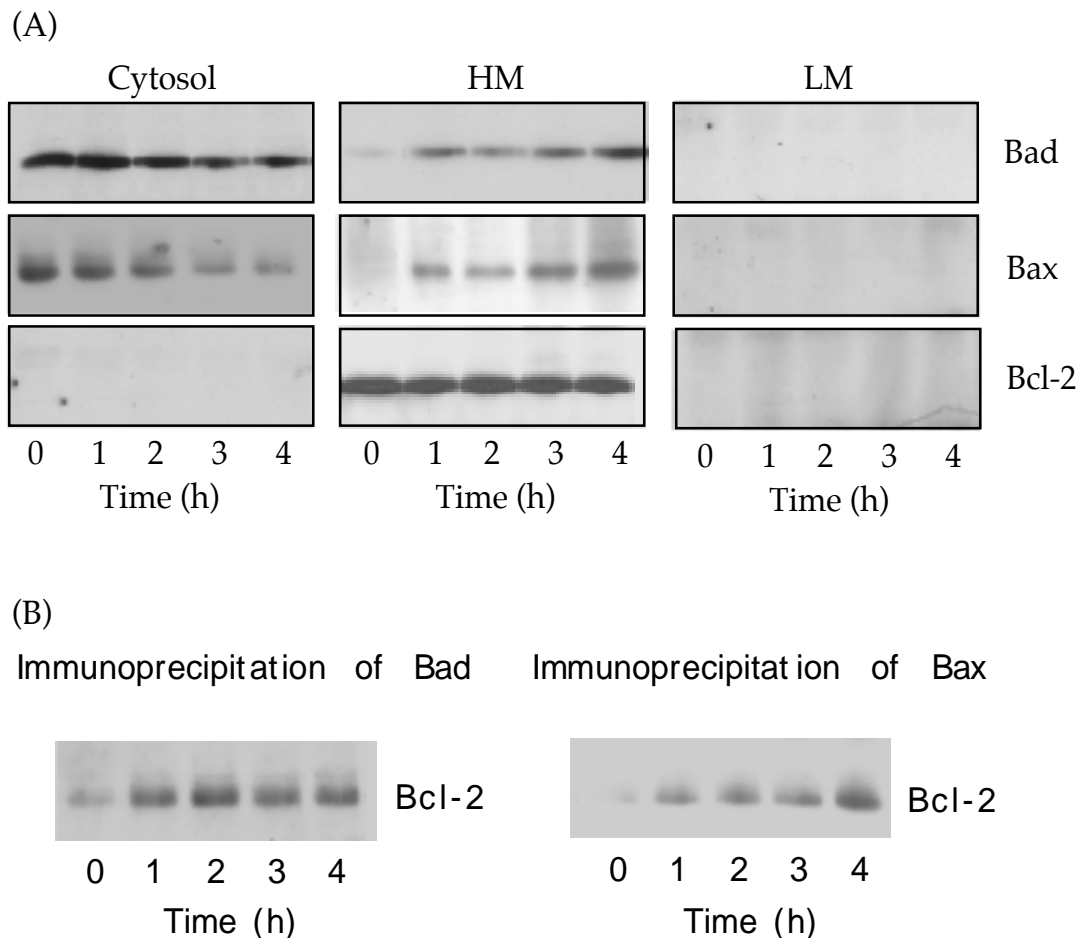
**Abbildung 26:** Immunoblot Detektion von  $O_2^{\bullet-}$ -induzierter Aktivierung von Mch2 $\alpha$  in Kardiomyozyten. Zellen wurden stimuliert mit 0.04 U XO/mL plus 0.1 mmol/L Xanthin in der Anwesenheit von 500 U/mL CAT. **A**, Bestimmung der DNA-Fragmentierung mittels ELISA. Z-VAD-fmk wurde in den angegebenen Konzentrationen 2 Stunden vor und unmittelbar nach Behandlung mit ROS zugegeben. \* $p < 0.05$ , verglichen mit XO/X+CAT allein. **B**, Immunoblot Analyse von Mch2 $\alpha$  und der aktiven Form p20, und **C**, von Lamin A und dem Spaltprodukt p46; Tiron (1 mmol/L), Z-VAD-fmk (50  $\mu$ mol/L). Dargestellt sind repräsentative Blots von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zur Translokation von Bax und Bad vom Zytosol zu den Mitochondrien und ihre Interaktion mit Bcl-2.*

Um die Faktoren zu identifizieren, die für die Freisetzung von Cytochrom C in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Apoptose von Kardiomyozyten verantwortlich sind, wurden nach der Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Zellen in ihre subzellulären Fraktionen aufgetrennt, in eine zytosolische Fraktion, eine Fraktion mit zellulären Bestandteilen aus schweren Membranen (HM, einschließlich der Mitochondrien) und einer Fraktion mit leichten Membranen (LM). Bad, Bax und Bcl-2, von all denen bekannt ist, daß sie an der Regulation der Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien beteiligt sind, wurden durch Zugabe ihrer spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und dann über ein SDS-PAGE der Immunoblot-Detektion zugeführt. Vor der Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> waren Bad und Bax vornehmlich in der zytosolischen Fraktion, und kaum in der HM-Fraktion, bzw. gar nicht in der LM-Fraktion nachweisbar (Abb. 27A). 1 Stunde nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> translozierten sowohl Bad, als auch Bax vom Zytosol zu den Mitochondrien (und nicht zu der LM-Fraktion). Vor und nach der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte Bcl-2 ausschließlich in der mitochondrien-reichen Fraktion

nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte die Stimulation mit  $\text{O}_2^-$  nicht zur nachweisbaren Translokation von Bcl-2, Bax oder Bad (Daten nicht dargestellt).

Um nachzuweisen, daß die Translokation von Bad und Bax auch eine Interaktion mit Bcl-2 zur Folge hat, einem Faktor, von dem bekannt ist, daß er Apoptose durch Verhinderung der Freisetzung von Cytochrom C antagonisiert (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997), wurden Immunpräzipitate von Bad oder Bax gegen einen Antikörper von Bcl-2 geblottet. Sowohl Bad, als auch Bax tauchten 1 Stunde nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Bcl-2-Komplexen der Kardiomyozyten auf (Abb. 27B). Hingegen konnten keine entsprechenden Komplexe in Kardiomyozyten nachgewiesen werden, die mit  $\text{O}_2^-$  stimuliert worden waren (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 27:** Subzelluläre Verteilung von Bad, Bax und Bcl-2 und die Interaktion von Bad oder Bax mit Bcl-2 in Kardiomyozyten, die für 1 Stunde mit 0.1 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  plus 0.1 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  behandelt und anschließend für die angegebene Zeitdauer in normalem Kulturmedium kultiviert wurden. **A**, Anschließend an die Präparation zytosolischer Fraktionen, Fraktionen mit schweren Membranen (HM) und Fraktionen mit leichten Membranen (LM) wurden Bad, Bax und Bcl-2 unter Verwendung ihrer spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und dann zur Immunblot-Detektion mittels SDS-PAGE aufgetrennt. **B**, Die Immunpräzipitation von Bad und Bax wurde in den Fraktionen mit schweren Membranen durchgeführt und die immunpräzipitierten Mengen wurden mittels Immunoblot und einem Anti-Bcl-2 Antikörper analysiert. Dargestellt sind repräsentative Blots von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Diese Daten belegen, daß die Freisetzung von Cytochrom C in Kardiomyozyten, die mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  exponiert wurden, parallel zur Translokation von Bad und Bax vom Zytosol an die Mitochondrien verläuft, wo diese Faktoren mit dem anti-apoptotischen Bcl-2 interagieren, was auf eine funktionelle Rolle dieser beiden Faktoren bei der Freisetzung von Cytochrom C in der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Apoptose von Kardiomyozyten hinweist. Das Ausbleiben der Translokation dieser beiden Faktoren bei  $\text{O}_2^-$ -induzierter Apoptose von Kardiomyozyten könnte den fehlenden Nachweis der Freisetzung von Cytochrom C bei dieser Form der Apoptose erklären.

#### **4.4 Diskussion**

ROS spielen eine bedeutende Rolle für die Pathogenese einer Vielzahl verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen. Das haben zahlreiche Studien in den letzten Jahren belegt. Es besteht aber weiterhin weitgehende Unklarheit über die Mechanismen, über die ROS die Struktur und Funktion von Herz und Gefäßen beeinflussen. Die vorgelegte Arbeit belegt erstmals, daß ROS Apoptose in Kardiomyozyten induzieren können und daß sie sich dabei unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege bedienen können.

Es gibt mehrere Belege für eine enge Beziehung zwischen p53 einerseits und oxidativem Stress andererseits. So konnte gezeigt werden, daß die Konformation und die DNA-bindende Aktivität von p53 durch das intrazelluläre Redox-Potential reguliert werden können (Hainaut et al., 1995). Ein potenter Transaktivator von p53 ist Ref-1, ein Redox/Reparatur Protein (Jayaraman et al., 1997). Außerdem führt die Überexpression von p53 zur Transaktivierung von Genen, die für Proteine kodieren, die durch oxidativen Stress aktiviert werden (Polyak et al., 1997). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$ , obwohl sie unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, zur Induktion der Expression von p53 führen. p53 kann Apoptose über die Transaktivierung des Bax-Gens induzieren, das mehrere p53-Bindungsstellen besitzt und für einen Apoptose-induzierenden Faktor kodiert (Miyashita and Reed, 1995). Überraschenderweise war in beiden Fällen die Induktion der Expression von p53 nicht von einer Induktion der Expression von Bax gefolgt. Hierfür gibt es zwei plausible Erklärungen: 1. obwohl die Expression von p53 in unserem Modell gesteigert wird, bleibt p53 funktionell inaktiv. Diese Möglichkeit wird gestützt durch die Beobachtung, daß p21<sup>CIP1</sup> in einer p53-unabhängigen Form durch oxidativen Stress aktiviert werden kann (Russo et al., 1995). 2. p53 induziert in diesem Modell Apoptose unabhängig von einer Transaktivierung von Bax, eine Möglichkeit, die bereits in anderen Zellmodellen beschrieben wurde (Ronca et al., 1997).

Bcl-2, ein bekannter anti-apoptotischer Faktor, kann Apoptose in Kardiomyozyten, die p53 überexprimieren, verhindern (Kirshenbaum and de Moissac, 1997). Weder  $\text{H}_2\text{O}_2$ , noch  $\text{O}_2^-$  führten zu wesentlichen Veränderungen in der Expression von Bcl-2. Um die funktionelle Aktivität von Vertretern der Bcl-2-Familie zu bestimmen, wurde in der vorgelegten Arbeit die Freisetzung von

Cytochrom C bestimmt, die engmaschig durch das Gleichgewicht aus anti-apoptotischem Bcl-2 und pro-apoptotischem Bax oder Bad reguliert wird (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997). Die Beteiligung von Cytochrom C in der Exekution der Apoptose wurde erst kürzlich beschrieben (Li et al., 1997; Liu et al., 1996). Die hier vorgelegten Daten belegen, daß Cytochrom C in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Apoptose freigesetzt wird, was auf eine prädominante Aktivität der pro-apoptotischen Vertreter der Bcl-2 Familie hinweist. Um dies nachzuweisen, wurde die subzelluläre Lokalisation von Bad und Bax bestimmt und ihre Translokation vom Zytosol an die Mitochondrien nachgewiesen. Diese subzelluläre Translokation veranlaßte zu der Spekulation, daß Bad und Bax Heterodimere mit dem mitochondrien-ständigen Bcl-2 formen, um dessen anti-apoptotische Wirkung zu antagonisieren. Diese Annahme wurde durch den Nachweis von Bad und Bax in Bcl-2-Komplexen in Kardiomyozyten, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert worden waren, bestätigt. Demnach dürfte die Translokation von Bad und Bax und ihre Interaktion mit Bcl-2 eine wichtige Rolle für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Freisetzung von Cytochrom C und der nachfolgenden Aktivierung der Kaspase CPP32 und Spaltung von PARP spielen. Dies zeigt erstmals die Existenz von Cytochrom C-abhängigen apoptotischen Signalwegen in Kardiomyozyten. Auf der anderen Seite belegt das Fehlen einer Freisetzung von Cytochrom C bei O<sub>2</sub><sup>-</sup>-induzierter Apoptose die Existenz Cytochrom C-unabhängiger apoptotischer Signalwege in Kardiomyozyten. O<sub>2</sub><sup>-</sup> hingegen benutzt einen apoptotischen Weg, der die Aktivierung einer anderen Kaspase, Mch2α, beinhaltet. Wennauch die präzise Substratzuordnung zu den verschiedenen Kaspasen noch nicht vollends geklärt ist, so scheint Mch2α dennoch die bislang einzige Laminase zu sein (Orth et al., 1996; Takahashi et al., 1996). Zwar kann sie *in vitro* auch PARP spalten, aber diese Aktivität ist vergleichsweise niedrig (Takahashi et al., 1996). Dies könnte auch erklären, warum in der vorgelegten Arbeit keine Spaltung von PARP nach Aktivierung von Mch2α durch O<sub>2</sub><sup>-</sup> beobachtet werden konnte.

Mittlerweile konnte Apoptose im Herzen bei Prozessen nachgewiesen werden, die bekannterweise mit der Generierung von ROS einhergehen, wie z. B. Ischämie und Reperfusion (Gottlieb et al., 1994). Allerdings konnten bislang nur wenige Faktoren identifiziert werden, die bei diesen und anderen pathophysiologischen Bedingungen Apoptose triggern. Die hier vorgelegten Daten bilden die erste Verbindung zwischen der Generierung von ROS einerseits, und der Induktion von Apoptose im Herzen andererseits.

ROS können bekannterweise eine Vielzahl verschiedener zellulärer Schäden anrichten, einschließlich der Lipidperoxidation von Membranen, dem Cross-Linking und der Degradation von Proteinen und der Mutagenese von DNA. Dies alles hat eine Beeinträchtigung der zellulären Integrität und Funktion zur Folge. So gesehen lassen sich unsere Resultate über die Induktion von Apoptose durch ROS als ein über die Evolution erhaltener Schutzmechanismus definieren, über den Zellen, die nicht adäquat funktionieren und die Integrität und Funktion des Herzens gefährden, beseitigt werden.

Zusammenfassend belegen diese Daten, daß ROS Apoptose in Kardiomyozyten erzeugen können.

Hierbei bedienen sich  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$  unterschiedlicher Signalwege mit der Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung der Kaspase CPP32 einerseits und der Aktivierung der Kaspase Mch2 $\alpha$  und Spaltung von Lamin A andererseits. Weiterführende Studien sind dringend indiziert, um zu klären, ob andere apoptotische Stimuli ebenfalls über den Cytochrom C/CPP32 Pfad laufen und ob sich durch Inhibition dieser Kaskade Apoptose in Kardiomyozyten verhindern läßt.

## 5. Literatur

- Absolom, D. R.. Basic methods for the study of phagocytosis. *Methods Enzymol* 1986;132:95-180.
- Acsadi, G., Jiao, S. S., Jani, A., Duke, D., Williams, P., Chong, W., and Wolff, J. A. Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo. *New Biol* 1991; 3, 71-81.
- Agah, R., Kirshenbaum, L. A., Abdellatif, M., Truong, L. D., Chakraborty, S., Michael, L. H., and Schneider, M. D.. Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium In vivo. *J Clin Invest* 1997;100, 2722-2728.
- Allegretto, E. A., Smeal, T., Angel, P., Spiegelman, B. M., and Karin, M.. DNA-binding activity of Jun is increased through its interaction with Fos. *J Cell Biochem* 1990;42, 193-206.
- Arai, H. K., Nakao, Y., Saito, N., Morii, A., Sugawara, T., Yamada, H., Itoh, S., Shiono, M., Mykoyama, H., and Ohkubo, S.. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricles of spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR-stroke prone rats. *Circ Res* 1988;62, 926-935.
- Argentin, S., Ardati, A., Tremblay, S., Lihmann, I., Robitaille, L., Drouin, J., and Nemer, M.. Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 1994;14, 777-90.
- Bloch, K. D., Seidman, J. G., Naftilan, J. T., Fallon, J. T., and Seidman, C. E.. Neonatal atrial and ventricles secrete atrial natriuretic factor via tissue-specific secretory pathways. *Cell* 1986;47, 695-702.
- Brasier, A. R., Tate, J. E., and Habener, J. F.. Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques* 1989;7, 1116-1122.
- Brooks, G., Poolman, R. A., McGill, C. J., and Li, J. M.. Expression and activities of cyclins and cyclin-dependent kinases in developing rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29, 2261-2271.
- Busch, S., and Sassone-Corsi, P.. Fos, Jun, CREB basic-domain peptides have intrinsic DNA-binding activity enhanced by a novel stabilizing factor. *Oncogene* 1990; 5, 1549-1556.
- Buttrick, P. M., Kass, A., Kitsis, R. N., Kaplan, M. L., and Leinwand, L. A.. Behavior of genes directly injected into the rat heart in vivo. *Circ Res* 1992; 70, 193-8.
- Catras, G. N., Takenaga, J., and McHale, C. G.. Effect of chronic administration of morphine on monoamine oxidase activity in discrete regions of the brain of rats. *Biochem Pharmacol* 1977; 26, 211-4.
- Coats, S., Flanagan, W. M., Nourse, J., and Roberts, J. M.. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 1996; 272, 877-80.
- Davies, S. W., Ranjadayan, K., Wickens, D. G., Dormandy, T. L., and Timmis, A. D.. Lipid peroxidation associated with successful thrombolysis. *Lancet* 1990; 335, 741-3.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J. R.. Distinct roles for E2F proteins in cell

- growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94, 7245-50.
- Deryckere, F., and Gannon, F.. A one-hour miniprep technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques* 1994; 16, 405.
- DeWet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramani, S.. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 1987; 7, 725-737.
- Drexler, H., Hänze, J., Finck, M., Lu, W., Just, H. J., and Lang, R. E.. Atrial natriuretic peptide in a rat model of cardiac failure. Atrial and ventricular mRNA, atrial content, plasma levels, and effect of volume loading. *Circulation* 1989; 79, 620-633.
- Edwards, B. S., Ackermann, D. M., Lee, M. E., Reeder, G. S., Wold, L. E., and Burnett, J. C.. Identification of atrial natriuretic factor within ventricular tissue in hamsters and humans with congestive heart failure. *J. Clin. Invest.* 1988; 81, 82-93.
- Field, L. J.. Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice. *Science* 1988; 239, 1029-1033.
- Field, S. J., Tsai, F. Y., Kuo, F., Zubiaga, A. M., Kaelin, W. G., Jr., Livingston, D. M., Orkin, S. H., and Greenberg, M. E.. E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* 1996; 85, 549-61.
- Firpo, E. J., Koff, A., Solomon, M. J., and Roberts, J. M.. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1994; 14, 4889-901.
- Flink, I. L., Oana, S., Maitra, N., Bahl, J. J., and Morkin, E.. Changes in E2F complexes containing retinoblastoma protein family members and increased cyclin-dependent kinase inhibitor activities during terminal differentiation of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30, 563-578.
- Goldstein, M. A., Claycomb, W. C., and Schwartz, A.. DNA synthesis and mitosis in well-differentiated mammalian cardiocytes. *Science* 1974; 183, 212-213.
- Gomez Foix, A. M., Coats, W. S., Baque, S., Alam, T., Gerard, R. D., and Newgard, C. B.. Adenovirus-mediated transfer of the muscle glycogen phosphorylase gene into hepatocytes confers altered regulation of glycogen metabolism. *J Biol Chem* 1992; 267, 25129-34.
- Gorman, C. M., Moffat, L. V., and Howard, B. H.. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 1982; 2, 1044-1051.
- Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., and Engler, R. L.. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94, 1621-8.
- Grueneberg, D. A., Natesan, S., Alexandre, C., and Gilman, M. Z.. Human and Drosophila homeodomain proteins that enhance the DNA-binding activity of serum response factor. *Science* 1992; 257, 1089-95.
- Hainaut, P., Rolley, N., Davies, M., and Milner, J.. Modulation by copper of p53 conformation and sequence-specific DNA binding: role for Cu(II)/Cu(I) redox mechanism. *Oncogene* 1995; 10, 27-32.
- Harper, J. W.. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* 1997; 29, 91-107.
- Harrington, E. A., Bennett, M. R., Fanidi, A., and Evan, G. I.. c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo J* 1994; 13, 3286-3295.
- Hasebe, N., Hittinger, L., Kohin, S., Shen, Y. T., Graham, R. M., and Vatner, S. F.. Effects of hypertrophy on left atrial and ventricular compliance and plasma ANF levels in conscious dogs. *Am J Physiol* 1995; 268, H781-7.
- Henderson, S. A., Spencer, M., Sen, A., Kumar, C., Siddiqui, M. A. O., and Chien, K. R.. Structure, organization and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene. *J. Biol. Chem.* 1989; 264, 18142-18148.
- Holmberg, C., Helin, K., Sehested, M., and Karlstrom, O.. E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene* 1998; 17, 143-55.

- Ito, H., Hiroe, M., Hirata, Y., Tsujino, M., Adachi, S., Shichiri, M., Koike, A., Nogami, A., and Marumo, F.. Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 1993; 87, 1715-21.
- Itoh, G., Tamura, J., Suzuki, M., Suzuki, Y., Ikeda, H., Koike, M., Nomura, M., Jie, T., and Ito, K.. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995; 146, 1325-31.
- Izumo, S., Lompre, A. M., Matsuoka, R., Koren, G., Schwartz, K., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V.. Myosin heavy chain mRNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 1987; 79, 970-977.
- Izumo, S., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V.. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 1986; 231, 597-600.
- Izumo, S., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V.. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85, 339-343.
- James, T. N.. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation* 1994; 90, 556-73.
- Jayaraman, L., Murthy, K. G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., and Prives, C.. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev* 1997; 11, 558-70.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., and Anversa, P.. The IGF-1-IGF-1 receptor system modulates myocyte proliferation but not myocyte cellular hypertrophy in vitro. *Exp Cell Res* 1994; 215, 273-83.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., and Anversa, P.. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74, 86-107.
- Kajstura, J., Mansukhani, M., Cheng, W., Reiss, K., Krajewski, S., Reed, J. C., Quaini, F., Sonnenblick, E. H., and Anversa, P.. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res* 1995; 219, 110-21.
- Kang, M. J., and Koh, G. Y.. Differential and dramatic changes of cyclin-dependent kinase activities in cardiomyocytes during the neonatal period. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29, 1767-1777.
- Kaplan, M. H., Daniel, C., Schindler, U., and Grusby, M. J.. Stat proteins control lymphocyte proliferation by regulating p27Kip1 expression. *Mol Cell Biol* 1998; 18, 1996-2003.
- Kariya, K., Farrance, I. K., and Simpson, P. C.. Transcriptional enhancer factor-1 in cardiac myocytes interacts with an alpha 1-adrenergic- and beta-protein kinase C-inducible element in the rat beta-myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem* 1993; 268, 26658-62.
- Kariya, K., Karns, L. R., and Simpson, P. C.. An enhancer core element mediates stimulation of the rat beta-myosin heavy chain promoter by an alpha 1-adrenergic agonist and activated beta-protein kinase C in hypertrophy of cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1994; 269, 3775-82.
- Kariya, K., Karns, L. R., and Simpson, P. C.. Expression of a constitutively activated mutant of the beta-isozyme of protein kinase C in cardiac myocytes stimulates the promoter of the beta-myosin heavy chain isogene. *J Biol Chem* 1991; 266, 10023-6.
- Kirshenbaum, L. A., Abdellatif, M., Chakraborty, S., and Schneider, M. D.. Human E2F-1 reactivates cell cycle progression in ventricular myocytes and represses cardiac gene transcription. *Dev. Biol.* 1996; 179, 402-411.
- Kirshenbaum, L. A., and de Moissac, D.. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 1997; 96, 1580-5.
- Kirshenbaum, L. A., and Schneider, M. D.. Adenovirus E1A represses cardiac gene transcription and reactivates DNA synthesis in ventricular myocytes, via alternative pocket protein- and p300-binding domains. *J. Biol. Chem.* 1995; 270, 7791-7794.
- Kitsis, R. N., Buttrick, P. M., McNally, E. M., Kaplan, M. L., and Leinwand, L. A.. Hormonal

- modulation of a gene injected into rat heart in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88, 4138-42.
- Kluck, R. M., Bossy Wetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D.. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275, 1132-6.
- Knowlton, K. U., Baracchini, E., Ross, R. S., Harris, A. N., Henderson, S. A., Evans, S. M., Glembofski, C. C., and Chien, K. R.. Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression. *J Biol Chem* 1991; 266, 7759-68.
- Knowlton, K. U., Rockman, H. A., Itani, M., Vovan, A., Seidman, C. E., and Chien, K. R.. Divergent pathways mediate the induction of ANF transgenes in neonatal and hypertrophic ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1995; 96, 1311-8.
- Koh, K. N., Kang, M. J., Frith-Terhune, A., Park, S. K., Kim, I., Lee, C. O., and Koh, G. Y.. Persistent and heterogenous expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27KIP1, in rat hearts during development. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30, 463-474.
- Kovacac-Milivojevic, B., and Gardner, D. G.. Divergent regulation of the human atrial natriuretic peptide gene by c-jun and c-fos. *Mol Cell Biol* 1992; 12, 292-301.
- Krukenkamp, I. B., Burns, P., Caldarone, C., and Levitsky, S.. Perfusion and cardioplegia. *Curr Opin Cardiol* 1994; 9, 247-53.
- Kulik, G., Klippel, A., and Weber, M.. Anti-apoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol-3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*. 1997; 17, 1595-1606.
- Kulik, G., and Weber, M.. Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol*. 1998; 18, 6711-6718.
- LaPointe, M. C., Wu, J., Greenberg, B., and Gardner, D. G.. Upstream sequences confer atrial-specific expression of the human atrial natriuretic factor gene. *J. Biol. Chem.* 1988; 263, 9075-9078.
- Lee, T. R., Bloch, K. D., Pfeffer, J. M., Pfeffer, M. A., Neer, E. J., and Seidman, C. E.. Atrial natriuretic factor gene expression in ventricles of rats with spontaneous ventricular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 1988; 81, 431-439.
- Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L., and Nevins, J. R.. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 1997; 387, 422-6.
- Li, F., Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R. C., Tomaselli, K. J., and Fritz, L. C.. Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J Biol Chem* 1997; 272, 30299-305.
- Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C., and Epstein, C. J.. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 1995; 11, 376-81.
- Lin, H., Parmacek, M. S., Morle, G., Bolling, S., and Leiden, J. M.. Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. *Circulation* 1990; 82, 2217
- Liu, Q., Yan, H., Dawes, N. J., Lu, Y., and Zhu, H.. Transcriptional activation of the p34cdc2 gene by cdc2 promoter binding factor/nuclear factor-Y in fetal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1998; 82, 251-260.
- Liu, Q., Yan, H., Dawes, N. J., Mottino, G. A., Frank, J. S., and Zhu, H.. Insulin-like growth factor II induces DNA synthesis in fetal ventricular myocytes in vitro. *Circ Res* 1996; 79, 716-26.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X.. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86, 147-57.
- Liu, Y., and Kitsis, R. N.. Induction of DNA synthesis and apoptosis in cardiac myocytes by E1A oncoprotein. *J Cell Biol* 1996; 133, 325-334.



- Lompre, A. M., Mercadier, C., Wisnewsky, P., Bouveret, D., Pantaloni, D., D'Albis, A., and Schwartz, K.. Species and age dependent changes in relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. *Dev. Biol* 1981; 84, 286-291.
- Lompre, A. M., Nadal-Ginard, B., and Mahdavi, V.. Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.* 1984; 259, 6437-6446.
- Lompre, A. M., Schwartz, K., D'Albis, D., Lacombe, G., Thiem, N. V., and Swynghedauw, B.. Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 1979; 282, 105-107.
- Mahdavi, V., Chambers, A. P., and Nadal-Ginard, B.. Alpha- and beta-myosin heavy chain genes are organized in tandem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81, 2626-2630.
- Mal, A., Poon, R. Y., Howe, P. H., Toyoshima, H., Hunter, T., and Harter, M. L.. Inactivation of p27Kip1 by the viral E1A oncoprotein in TGFbeta-treated cells. *Nature* 1996; 380, 262-5.
- Mallat, Z., Tedgui, A., Fontaliran, F., Frank, R., Durigon, M., and Fontaine, G.. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996; 335, 1190-1196.
- Mann, D. J., Higgins, T., Jones, N. C., and Rozengurt, E.. Differential control of cyclins D1 and D3 and the cdk inhibitor p27Kip1 by diverse signalling pathways in Swiss 3T3 cells. *Oncogene* 1997; 14, 1759-66.
- Matsubara, H., Hirata, Y., Yoshimi, S., Takata, Y., Takagi, Y., Umeda, Y., Yamane, Y., and Inada, M.. Role of calcium and protein kinase C in ANP secretion by rat cardiocytes. *Am. J. Physiol.* 1988; 255, H405-409.
- McBride, K., Robitaille, L., Tremblay, S., Argentin, S., and Nemer, M.. fos/jun repression of cardiac-specific transcription in quiescent and growth-stimulated myocytes is targeted at a tissue-specific cis element. *Mol Cell Biol* 1993; 13, 600-12.
- Miyashita, T., and Reed, J. C.. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80, 293-9.
- Morgan, D. O.. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374, 131-134.
- Nakabeppu, Y., Ryder, K., and Nathans, D.. DNA binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell* 1988; 55, 907-915.
- Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T., Kolodgie, F., Hajjar, R., Schmidt, U., Semigran, M., Dec, G., and Khaw, B.. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335, 1182-1189.
- Okeefe, D., Hoffmann, J., Cheitin, R., O'Neill, M., Allard, J., and Shapkin, E.. Coronary blood flow in experimental canine left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 1978; 43, 43-51.
- Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Garg, M., Froelich, C. J., and Dixit, V. M.. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 1996; 271, 16443-6.
- Osterziel, K. J., Stroh, O., Schuler, J., Friedrich, M., Hanlein, D., Willenbrock, R., Anker, S. D., Poole-Wilson, P. A., Ranke, M. B., and Dietz, R.. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of human recombinant growth hormone in patients with chronic heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1998; 351, 1233-1237.
- Overbeck, P. A., Lai, S. P., Van Quill, K. R., and Westphal, H.. Tissue-specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal sequences. *Science* 1986; 231, 1574-1577.
- Parmacek, M. S., Vora, A. J., Shen, T., Barr, E., Jung, F., and Leiden, J. M.. Identification and characterization of a cardiac-specific transcriptional regulatory element in the slow/cardiactroponin C gene. *Mol Cell Biol* 1992; 12, 1967-76.
- Parrizas, M., Saltiel, A., and LeRoith, D.. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* 1997; 272, 154-161.

- Pines, J.. Cyclins, CDKs and cancer. *Semin Cancer Biol* 1995; 6, 63-72.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B.. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389, 300-5.
- Rascher, W., Tulassy, T., and Lang, R. E.. Atrial natriuretic peptide in plasma of volume-overloaded children with chronic renal failure. *Lancet* 1985; 2, 303-305.
- Rauscher, F. J., Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J., and Spiegelman, B. M.. Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 1988; 52, 471-480.
- Reiss, K., Cheng, W., Ferber, A., Kajstura, J., Li, P., Li, B., Olivetti, G., Homcy, C. J., Baserga, R., and Anversa, P.. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93, 8630-5.
- Reynisdottir, I., and Massague, J.. The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev* 1997; 11, 492-503.
- Roberts, M. J., Young, I. S., Trouton, T. G., Trimble, E. R., Khan, M. M., Webb, S. W., Wilson, C. M., Patterson, G. C., and Adgey, A. A.. Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty. *Lancet* 1990; 336, 143-5.
- Rockman, H. A., Ross, R. S., Harris, A. N., Knowlton, K. U., Steinhilper, M. E., Field, L. J., Ross, J., Jr., and Chien, K. R.. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88, 8277-81.
- Roesler, W. J., Vandenbark, G. R., and Hanson, R.. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J. Biol. Chem.* 1988; 263, 9063-9066.
- Ronca, F., Chan, S. L., and Yu, V. C.. 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine induces apoptosis in human neuroblastoma cells, SH-SY5Y, through a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* 1997; 272, 4252-60.
- Rosenzweig, A., Halazonetis, T. D., Seidman, J. G., and Seidman, C. E.. Proximal regulatory domains of rat atrial natriuretic factor gene. *Circulation* 1991; 84, 1256-65.
- Russo, T., Zambrano, N., Esposito, F., Ammendola, R., Cimino, F., Fiscella, M., Jackman, J., O'Connor, P. M., Anderson, C. W., and Appella, E.. A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J Biol Chem* 1995; 270, 29386-91.
- Sadoshima, J., Aoki, H., and Izumo, S.. Angiotensin II and serum differentially regulate expression of cyclins, activity of cyclin-dependent kinases, and phosphorylation of retinoblastoma gene product in neonatal cardiac myocytes. *Circ Res* 1997; 80, 228-41.
- Sadoshima, J., and Izumo, S.. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *Embo J* 1993; 12, 1681-92.
- Sadoshima, J., and Izumo, S.. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993; 73, 413-23.
- Schiaffino, S., Samuel, J., Sasson, D., Lompre, A., Garner, I., Marotte, F., Buckingham, M., Rappaport, L., and Schwartz, K.. Nonsynchronous accumulation of alpha skeletal muscle actin and beta myosin heavy chain mRNAs during early stages of pressure overload-induced cardiac hypertrophy demonstrated by in situ hybridization. *Circ Res* 1989; 64, 937-948.
- Seed, B., and Sheen, J. Y.. A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene* 1988; 67, 271-277.
- Seidman, C. E., Wong, D. W., Jarcho, J. A., Bloch, K. D., and Seidman, J. G.. Cis-acting sequences that modulate atrial natriuretic factor gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85, 4104-4108.
- Sen, A., Dunnmon, P., Henderson, S. A., Gerard, R. D., and Chien, K. R.. Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions

- following expression of SV40 large T antigen. *J Biol Chem* 1988; 263, 19132-19136.
- Sheng, M., Dougan, S. T., McFadden, G., and Greenberg, M.. Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* 1988; 8, 2787-2796.
- Sheng, M., and Greenberg, M. E.. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990; 4, 477-85.
- Simpson, P.. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha-adrenergic response. *J. Clin. Invest.* 1983; 72, 732-738.
- Simpson, P., McGrath, A., and Savion, S.. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* 1982; 51, 787-801.
- Soonpaa, M. H., Kim, K. K., Pajak, L., Franklin, M., and Field, L. J.. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol* 1996; 271, H2183-9.
- Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., Pajak, L., Jing, S., Wang, H., Franklin, M. T., Kim, K. K., and Field, L. J.. Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice. *J Clin Invest* 1997; 99, 2644-2654.
- Sprenkle, A. B., Murray, S. F., and Glembofski, C. C.. Involvement of multiple cis elements in basal- and alpha-adrenergic agonist-inducible atrial natriuretic factor transcription. Roles for serum response elements and an SP-1-like element. *Circ Res* 1995; 77, 1060-9.
- Swain, J. L., Stewart, T. A., and Leder, P.. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: A molecular mechanism for parental imprinting. *Cell* 1987; 50, 719-727.
- Takahashi, A., Alnemri, E. S., Lazebnik, Y. A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C.. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93, 8395-400.
- Tang, D. C., DeVit, M., and Johnston, S. A.. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356, 152-4.
- Thompson, W. R., Nadal Ginard, B., and Mahdavi, V.. A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the beta-myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 1991; 266, 22678-88.
- Thorburn, A., Thorburn, J., Chen, S. Y., Powers, S., Shubeita, H. E., Feramisco, J. R., and Chien, K. R.. HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1993; 268, 2244-9.
- Toyoshima, H., and Hunter, T.. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78, 67-74.
- von Harsdorf, R., Lang, R., Fullerton, M., Smith, A. I., and Woodcock, E. A.. Right atrial dilatation increases inositol-(1,4,5)trisphosphate accumulation. Implications for the control of atrial natriuretic peptide release. *FEBS Lett* 1988; 233, 201-5.
- von Harsdorf, R., Lang, R. E., Fullerton, M., and Woodcock, E. A.. Myocardial stretch stimulates phosphatidylinositol turnover. *Circ Res* 1989; 65, 494-501.
- Wang, J., and Walsh, K.. Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 1996; 273, 359-61.
- Wang, L., Ma, W., Markovich, R., Chen, J., and Wang, P.. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res.* 1998; 83, 516-522.
- Widom, R. L., Ladas, J. A., Kouidou, S., and Karathanasis, S. K.. Synergistic interactions between transcription factors control expression of the apolipoprotein AI gene in liver cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11, 677-87.

- Winston, J., Dong, F., and Pledger, W. J.. Differential modulation of G1 cyclins and the Cdk inhibitor p27kip1 by platelet-derived growth factor and plasma factors in density-arrested fibroblasts. *J Biol Chem* 1996; 271, 11253-60.
- Wolff, J. A., Luttke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., and Jani, A.. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992; 1, 363-9.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L.. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247, 1465-8
- Wolff, J. A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A., and Chong, W.. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* 1991; 11, 474-85
- Wu, J., Deschepper, C. F., and Gardner, D. G.. Perinatal expression of the atrial natriuretic factor gene in rat cardiac tissue. *Am. J. Physiol* 1988; 255, E388-E396.
- Wu, J., LaPointe, M. C., West, B. L., and Gardner, D. G.. Tissue-specific determinants of human atrial natriuretic factor gene expression in cardiac tissue. *J. Biol. Chem.* 1989; 264, 6472-6479.
- Xenophontos, S. P., Watson, P. A., Chua, B. H. L., Haneda, T., and Morgan, H. E.. Increased cyclic AMP content accelerates protein synthesis in rat heart. *Circ Res* 1989; 65, 647-656.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X.. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275, 1129-32.
- Yoshizumi, M., Lee, W. S., Hsieh, C. M., Tsai, J. C., Li, J., Perrella, M. A., Patterson, C., Endege, W. O., Schlegel, R., and Lee, M. E.. Disappearance of cyclin A correlates with permanent withdrawal of cardiomyocytes from the cell cycle in human and rat hearts. *J Clin Invest* 1995; 95, 2275-2280.
- Zak, R.. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res* 1974; 35, suppl II:17-26.
- Zhu, H., Garcia, A. V., Ross, R. S., Evans, S. M., and Chien, K. R.. A conserved 28-base-pair element (HF-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells. *Mol Cell Biol* 1991; 11, 2273-81.
- Zweier, J. L., Flaherty, J. T., and Weisfeldt, M. L.. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84, 1404-7.

## 6. ALPHABETISCH GELISTETE ABKÜRZUNGEN

$\alpha$ MHC	=	$\alpha$ -Myosin-Schwerkette
ANF	=	atrialer natriuretischer Faktor
$\beta$ MHC	=	$\beta$ -Myosin-Schwerkette
CAT	=	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (Abschnitt 1)
CAT	=	Catalase (Abschnitt 3)
HM	=	<i>heavy membrane fraction</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Wasserstoffperoxid
IGF-I	=	<i>insulin-like growth factor-I</i>
MSV	=	<i>mouse sarcoma virus</i>
MTT	=	3-(4,5-Dimethyl-Thiazol-2-yl)2,5-Diphenyl-Tetrazolium- Bromid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	=	Superoxidanion
ROS	=	<i>reactive oxygen species</i>
RSV	=	<i>rouse sarcoma virus</i>
SOD	=	Superoxid-Dismutase
XO/X	=	Xanthin-Oxidase / Xanthin

## 7. DANKSAGUNGEN

Es ist mir ein großes Anliegen, an dieser Stelle Personen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen meiner Habilitationsarbeit verhalfen, meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Dazu zählen *Prof. Dr. Rudolf Lang* und *Prof. Dr. Detlev Ganten*, unter deren Fittichen ich meine ersten eigenständigen wissenschaftlichen Gehversuche im Rahmen meiner medizinischen Doktorarbeit am Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg unternahm und von denen ich essentielle Prinzipien wissenschaftlichen Arbeitens beigebracht bekam.

Dazu zählt *Prof. Dr. Hanjörg Just*, der als Direktor der Medizinischen Klinik der Universität Freiburg mich nicht nur die hohe Kunst der Anamnese und körperlichen Untersuchung im Rahmen meiner ärztlichen Ausbildung lehrte, sondern der sehr frühzeitig die Notwendigkeit des Verständnisses der Molekularbiologie für die moderne Medizin erkannte und mir nahelegte.

Dazu zählt *Prof. Dr. Bernardo Nadal-Ginard* von der Harvard Medical School, Boston, bei dem ich im Rahmen eines zweijährigen Stipendiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft die wichtigsten Grundzüge der Molekularbiologie erlernte und der mir bis heute ein wichtiges Vorbild ist, da er *in personam* medizinische und molekularbiologische Erkenntnisse vereint. Bei *Prof. Dr. Stephen Vatner* lernte ich während meines Aufenthaltes an der Harvard Medical School die Bedeutung der Experimente mit Tiermodellen zu schätzen, die die Grundlage für das Verständnis der Hämodynamik und damit für unser ärztliches Handeln bilden.

Dazu zählt ganz besonders *Prof. Dr. Rainer Dietz*, ohne dessen Weitsicht, Geduld und rückhaltloser Unterstützung meine akademische Laufbahn vielleicht einen ganz anderen Weg gegangen wäre. Von ihm erhielt ich den Raum und die Freiheit, mich nun eigenständig zu entwickeln und meinen persönlichen medizinischen und wissenschaftlichen Neigungen nachzugehen.

## **Erklärung an Eides statt**

Ich erkläre hiermit, daß die hier vorliegende Habilitation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter angefertigt wurde. Sie stellt, auch nicht in Teilen, keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, Juni 2000

Rüdiger v. Harsdorf

## Wissenschaftlicher Werdegang

1981-1989 Studium der Humanmedizin, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

1985 3-monatige klinische Famulatur, Texas Heart Institute, Houston, U.S.A.

1987 Stipendiat, Deutsche Liga zur Bluthochdruckbekämpfung, Dept. of Medicine, Monash University, Melbourne, Australien (Direktor: Prof. J. Funder): "Untersuchung der Induzierbarkeit des Phosphatidyl-Inositolphosphatzykluses im Säugetierherzen."

1986-89 Dissertation (Doktorvater: Prof. R. Lang), Pharmakologisches Institut (Direktor: Prof. D. Ganten), Universität Heidelberg: "Untersuchungen zur Rolle des Calciums bei der Freisetzung des atrialen natriuretischen Faktors (ANF)."

1989 Graduierung und Verleihung der Doktorwürde der Universität Heidelberg (*summa cum laude*)

1989-1990 Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik, Universität Freiburg (Direktor: Prof. H-J. Just)

1990 Approbation zum Arzt

1991 amerikanisches Staatsexamen für Humanmedizin (ECFMG)

1991-1992 Stipendiat, Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha-1777/1-1), Dept. of Cardiology, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, U.S.A. (Direktor: Prof. B. Nadal-Ginard)

1993-1999 wissenschaftlicher Assistent der Franz-Volhard-Klinik, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin (Direktor: Prof. R. Dietz)

### Forschungsarbeiten mit dem Schwerpunkt:

a. Molekulare Grundlagen der Herzinsuffizienz (Regulation von Zellwachstum, Zellzyklusarrest und Zelltod im Herzen und die Bedeutung freier Sauerstoffradikale in diesem Zusammenhang)

b. Bedeutung freier Sauerstoffradikale (oxidativer Stress) für den Phänotyp von glatten Gefäßmuskelzellen

Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG: Ha-1777/6-1 und Ha-1777/6-2) und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF: 01 GB 9402)

12/1998 Facharzt für Innere Medizin